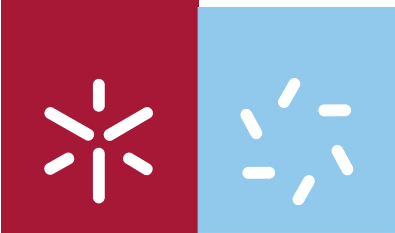




Ricardo Sarmento Andrade **O papel da diversidade genética dos fungos na decomposição da matéria orgânica nos rios: uma experiência em microcosmos**

UMinho | 2011

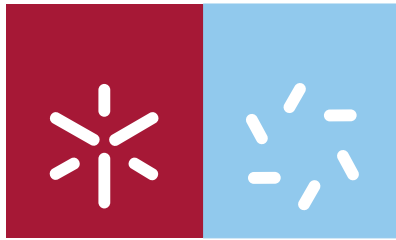


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ricardo Sarmento Andrade

O papel da diversidade genética dos fungos na decomposição da matéria orgânica nos rios: uma experiência em microcosmos

Outubro de 2011



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ricardo Sarmento Andrade

**O papel da diversidade genética dos fungos
na decomposição da matéria orgânica nos
rios: uma experiência em microcosmos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ecologia

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Doutora Fernanda Cássio
e da
Professora Doutora Cláudia Pascoal

Outubro de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, Outubro de 2011

(Ricardo Sarmento Andrade)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que tornaram possível esta tese:

À Dra. Fernanda Cássio e à Dra. Cláudia Pascoal, por me terem dado esta oportunidade e pela orientação científica;

Ao Dr. João Paulo Cabral, a quem devo os primeiros passos na investigação e o interesse pela microbiologia e micologia;

Aos meus colegas no laboratório, cuja colaboração foi preciosa: Sofia, Isabel, Paulo e Arunava;

Aos meus colegas na escola onde leciono, Escola Secundária João Gonçalves Zarco, pelo apoio em diferentes ocasiões e ajuda pronta;

Aos amigos Eugénio, Sónia, Laura, Helena e João;

Ao meu pai.

Resumo

O papel da diversidade genética dos fungos na decomposição da matéria orgânica nos rios: uma experiência em microcosmos

A biodiversidade no planeta tem vindo a diminuir, como resultado do aumento da pressão antropogénica, sendo necessário investigar quais as componentes da biodiversidade que sustentam o funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas. Têm-se verificado relações positivas entre o aumento da diversidade e os processos dos ecossistemas, mas poderão ocorrer relações neutras ou mesmo negativas. Para compreender estas relações, torna-se relevante esclarecer o conceito de biodiversidade e determinar quais as métricas (biodiversidade de espécies, de genótipos, divergência genética e diversidade funcional de uma comunidade) que melhor traduzem os processos ecológicos.

Os fungos aquáticos desempenham um papel decisivo na decomposição da matéria orgânica em ecossistemas ribeirinhos e têm sido utilizados para investigar os efeitos da biodiversidade no funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Neste estudo investigou-se o efeito da biodiversidade de fungos na decomposição da folhada, numa experiência em microcosmos, avaliando os efeitos do número e identidade de espécies e de genótipos e o efeito da divergência genética da comunidade em três parâmetros funcionais: a perda de massa da folhada, a produção de biomassa pelos fungos e o seu potencial reprodutor.

Os resultados mostraram que os três parâmetros funcionais não responderam de forma semelhante ao aumento da diversidade e as três medidas de diversidade avaliadas não refletiram exatamente os mesmos padrões. O aumento da diversidade teve um efeito positivo nas funções examinadas, particularmente na produção de biomassa. Contudo, a partir de determinados níveis de diversidade, verificou-se ausência de resposta ou mesmo inibição dos processos avaliados. A divergência genética das comunidades foi um melhor preditor da produção de biomassa; o número de genótipos foi mais relevante para a decomposição; e o número e a identidade dos genótipos e das espécies foram determinantes para explicar a esporulação. A utilização de diferentes métricas de biodiversidade é, assim, necessária, para compreender os impactos funcionais da perda de biodiversidade nos ecossistemas, provavelmente porque diferentes mecanismos podem explicar os efeitos da biodiversidade em diferentes processos ecológicos relacionados.

Abstract

The role of fungal genetic diversity in organic matter decomposition in freshwaters: a microcosm experiment

The impacts of biodiversity loss, mainly due to increasing anthropogenic pressures on ecosystems, are of major concern. Therefore, the investigation on the components of biodiversity that best support the functioning and stability of ecosystems is timely and relevant. Positive relationships between biodiversity and ecosystem processes have been observed; however, this might not be the rule, and null or even negative relationships can occur. Besides, it is also relevant to determine which measures of biodiversity (species diversity, genotype diversity, phylogenetic diversity or functional diversity) best describe the relations between biodiversity and ecological processes.

Aquatic fungi play a crucial role in the decomposition of plant detritus in freshwaters and they have been used to examine the effects of biodiversity in these ecosystems. In this study, the effects of the number and identity of species and genotypes and the effects of genetic divergence of fungal communities were assessed on three functional parameters: leaf mass loss, fungal biomass production and sporulation rates.

Results showed that the performances of fungal communities increased with the increase in biodiversity, particularly for biomass production, but at higher levels of biodiversity null or even negative responses were observed. Furthermore, the three measures of biodiversity did not show the same pattern. Genetic divergence was a measure that best predicted biomass production; the number of genotypes was more critical for leaf decomposition by aquatic fungi; while the number of species and the identity of genotypes and species best explained sporulation rates. The results suggest that different biodiversity measures are needed to fully describe ecosystem functioning, probably because different mechanisms may explain biodiversity effects on related ecological processes.

Índice

1. Introdução	3
1.1. Biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas	5
1.1.1. Hipóteses que explicam os impactos funcionais da biodiversidade	5
1.1.2. Medidas de biodiversidade	7
1.1.3. Experiências em microcosmos	8
1.1.4. Efeitos da biodiversidade	9
1.2. Os hifomicetos aquáticos no contexto da decomposição da matéria orgânica	10
1.2.1. Importância dos hifomicetos aquáticos	10
1.2.2. Diversidade inter e intraespecífica de hifomicetos aquáticos	11
1.3. O sistema decompositor como modelo para estudar as relações biodiversidade-funcionamento dos ecossistemas	11
1.4. Estudos em microcosmos com hifomicetos aquáticos	12
2. Metodologia	14
2.1. Caracterização dos fungos	14
2.2. Preparação dos microcosmos	19
2.3. Determinação da perda de massa foliar	20
2.4. Quantificação da biomassa de fungos nas folhas em decomposição	20
2.5. Avaliação da taxa de esporulação dos fungos	21
2.6. Tratamento estatístico dos dados	21
3. Resultados	23
3.1. Decomposição das folhas	23
3.2. Biomassa de fungos	29
3.3. Esporulação	35
4. Discussão	42
5. Bibliografia	48

Índice das figuras

Figura 1 – Esporos dos hifomicetos	15
Figura 2 – Árvore filogenética representando as distâncias entre as diferentes estirpes de <i>Articulospora tetracladia</i>	17
Figura 3 – Árvore filogenética representando as distâncias entre as diferentes estirpes e espécies	18
Figura 4 - Consumo de folha por hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas	23
Figura 5 – Consumo de folha por hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies, com 1 a 8 genótipos e com diferentes níveis de divergência genética média	26
Figura 6 – Efeito do número de espécies, do número de genótipos e da divergência genética média das comunidades no consumo de folha	28
Figura 7 - Biomassa de fungos em monoculturas e policulturas	29
Figura 8 – Biomassa produzida pelos hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies, com 1 a 8 genótipos e com diferentes níveis de divergência genética média	33
Figura 9 – Efeito do número de espécies, do número de genótipos e da divergência genética média das comunidades na biomassa de fungos	34
Figura 10 – Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos presentes em monoculturas e policulturas	36
Figura 11 – Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies, 1 a 8 genótipos e com diferentes níveis de divergência genética média	39
Figura 12 – Efeito do número de espécies, do número de genótipos e da divergência genética média das comunidades na taxa de esporulação	41
Figura 13 – Regressão linear entre a folha consumida pelos hifomicetos aquáticos e as taxas de esporulação e a biomassa de hifomicetos aquáticos	45

Índice de tabelas

Tabela I – Referência dos isolados de hifomicetos aquáticos, localização do rio de onde foram isolados, substrato de origem e código do GenBank	14
Tabela II – Percentagem de divergência genética dos hifomicetos aquáticos baseada nas sequências das regiões ITS	16
Tabela III: Desenho experimental hierarquizado	20
Tabela IV –Nested ANOVA do efeito do número de espécies da identidade das espécies na quantidade de folha consumida	25
Tabela V – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos e da identidade genética na quantidade de folha consumida	25
Tabela VI – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na quantidade de folha consumida	25
Tabela VII – Nested ANOVA do efeito do número de espécies e da identidade das espécies na biomassa produzida	31
Tabela VIII – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos e da identidade genética na biomassa produzida	31
Tabela IX – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na biomassa produzida	31
Tabela X – Nested ANOVA do efeito do número de espécies e da identidade das espécies na taxa de esporulação	38
Tabela XI – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos e da identidade genética na taxa de esporulação	38
Tabela XII – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na taxa de esporulação	38

“Conviene abandonar la idea de que el medio, mecánicamente, modele la vida; por lo tanto, que la vida sea un proceso de fuera a dentro. Las modificaciones externas actúan sólo como excitantes de modificaciones intraorgánicas; son, más bien, preguntas a que el ser vivo responde con un amplio margen de originalidad imprevisible. Cada especie, y aun cada variedad, y allí cada individuo, aprontará una respuesta más o menos diferente, nunca idéntica. Vivir, en suma, es una operación que se hace de dentro a fuera, y por eso las causas o principios de sus variaciones hay que buscarlos en el interior del organismo.”

José Ortega y Gasset *in* La rebelión de las masas, 1937

1. Introdução

A biodiversidade, no seu sentido mais abrangente, refere-se ao número, abundância, composição, distribuição no espaço e variação temporal, tipos funcionais e interações de genótipos, espécies, populações e comunidades de um dado sistema (Diaz et al. 2006).

O estado da biodiversidade no planeta (cobrindo espécies, populações, comunidades, riscos de extinção e habitats) tem vindo a piorar, provavelmente devido ao contínuo aumento da pressão sobre os ecossistemas, incluindo a diminuição dos recursos, o aumento de espécies invasoras, a eutrofização, a sobre-exploração dos recursos e as alterações climáticas. Apesar disso, alguns sucessos a nível local têm sido alcançados, como consequência da criação de áreas protegidas, de políticas sustentáveis e pró-ambientais (Butchart et al. 2010).

Neste contexto, da deterioração global do ambiente, um dos mais difíceis e importantes desafios da Biologia atual é conseguir que o maior número possível de espécies sobreviva ao efeito gargalo dos próximos séculos. Isso só pode ser conseguido se os biólogos forem suficientemente claros quanto às implicações dos seus estudos para o aperfeiçoamento de medidas e políticas de conservação da biodiversidade e gestão ambiental (Barnard & Wilfried 2008).

Sendo que os biomas terrestres regulam o fluxo de energia e matéria no planeta, incluindo a absorção do carbono atmosférico, a produção de oxigénio e os ciclos de nutrientes (Reiss et al. 2009), é necessário investigar quais os componentes da biodiversidade que sustentam o funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas, aspetos que têm sido alvo de intensa investigação nas duas últimas décadas (O’Gorman et al. 2011).

A questão decisiva é: serão os ecossistemas com menor número de espécies menos eficientes do que os sistemas mais ricos dos quais derivam e estarão condenados a perder gradualmente as suas capacidades funcionais (Loreau 2010), essenciais para o bem-estar da humanidade (Diaz et al. 2006)?

Além disso, o estudo da relação da biodiversidade com o funcionamento dos ecossistemas é também relevante para a ecologia teórica, estando também em discussão o próprio conceito de biodiversidade (Loreau 2010).

Várias hipóteses explicativas das relações entre a biodiversidade, o funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas têm sido propostas (Pascoal & Cássio 2008). A hipótese da redundância assume que muitas espécies desempenham a mesma função nos ecossistemas,

sendo funcionalmente redundantes, e, portanto, a perda de uma espécie pode ser compensada por outras espécies. De acordo com esta hipótese, o funcionamento de um ecossistema pode ser mantido, desde que presentes todos os grupos funcionais. A hipótese da diversidade-estabilidade preconiza que o aumento da diversidade promove a estabilidade dos ecossistemas, por meio de complementaridade dos traços/fenótipos funcionais. Assim, a biodiversidade pode constituir uma segurança para os ecossistemas: um ecossistema com maior biodiversidade deverá garantir a presença de diferentes grupos funcionais e permitir uma variabilidade nas repostas individuais aos fatores ambientais (Yachi & Loreau 1999). Esta hipótese admite que a redundância predomina para garantir o funcionamento e estabilidade de um ecossistema, mas existirá um nível limite de diversidade abaixo do qual o funcionamento do ecossistema é comprometido.

Por outro lado, a hipótese idiossincrática preconiza que a relação entre biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas não segue um padrão determinado, dependendo sobretudo da identidade das espécies presentes, da sequência segundo a qual as espécies desaparecem do ecossistema, do contexto ambiental e dos recursos disponíveis (Reiss et al. 2010).

Os microrganismos têm vindo a ser extensivamente usados para testar as hipóteses explicativas das relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (Bell et al. 2009; Reiss et al. 2010). Reiss et al. (2010) apontam vantagens da utilização dos microrganismos para estudos de ecologia, realizados no campo ou em laboratório: os microrganismos são fáceis de manipular, têm tempos de geração curtos, podem revelar padrões e respostas também encontrados em organismos de maior dimensão, desempenham papéis determinantes na regulação e manutenção de muitos processos ecológicos.

Em particular, os estudos em microcosmos com os fungos aquáticos designados por hifomicetos aquáticos têm permitido testar hipóteses sobre as relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas, sugerindo que a biodiversidade poderá ser uma salvaguarda dos ecossistemas às alterações ambientais (Pascoal & Cássio 2008).

Uma outra questão, relacionada com o debate sobre os efeitos da biodiversidade no funcionamento dos ecossistemas, é a discussão do próprio conceito de biodiversidade (King 2009). Tradicionalmente, tem-se considerado a espécie como a unidade da biodiversidade, no entanto, este conceito poderá ser restritivo, avaliando-se atualmente a importância de traços/fenótipos funcionais (Diaz et al. 2006), não só específicos, mas também intraespecíficos. Por outro lado, a diversidade genética de uma comunidade (King 2009), a diversidade no espaço e

no tempo e ao longo das cadeias tróficas têm sido também analisadas (Gamfeldt & Hillebrand 2008; Woodward. 2009; Lecerf & Richardson 2010; Kominoski et al. 2010). Para além da diversidade, nos seus diversos níveis, existem outras questões relacionadas que podem afetar os processos dos ecossistemas, como a densidade de cada unidade de biodiversidade e o número de taxa com interações relevantes nas comunidades naturais (Woodward 2009).

Neste estudo procurou-se contribuir para o debate da importância da biodiversidade para o funcionamento dos ecossistemas, usando como modelo a decomposição da matéria orgânica por fungos aquáticos. Numa experiência em microcosmos, e com diferentes combinações de espécies e estirpes de fungos aquáticos, foram avaliados três parâmetros funcionais: a decomposição da folhada, a produção de biomassa pelos fungos e o seu potencial reprodutor. Especificamente, pretendeu-se investigar i) qual o efeito do número de espécies, genótipos e divergência genética de fungos ii) qual o efeito da identidade dos traços intraespecíficos versus interespecíficos, iii) qual o efeito da identidade do genótipo versus diversidade do genótipo.

1.1. Biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas

1.1.1. Hipóteses que explicam os impactos funcionais da biodiversidade

A evidência de efeitos positivos da diversidade nos processos dos ecossistemas não é ubíqua, nem inequívoca (Reiss et al. 2009). Os estudos desenvolvidos neste campo procuram projetar graficamente os parâmetros funcionais em estudo em função da riqueza específica, ou de outra unidade que reflita a diversidade, sendo a diversidade uma variável preditiva do processo analisado. A linha de tendência poderá, por exemplo, sugerir redundância, quando o processo satura a partir de um determinado nível de diversidade, ou complementaridade, quando as comunidades mais diversas têm melhor desempenho (Reiss et al. 2009).

Os mecanismos que explicam os efeitos da biodiversidade nos processos ecológicos podem ser divididos em duas classes (Loreau & Hector 2001):

Seleção de traços funcionais que afetam a competitividade das espécies – o efeito de amostragem, também designado de efeito de seleção. Basicamente, o efeito de amostragem resulta do facto de em comunidades mais diversas aumentar a probabilidade de existirem espécies dominantes com traços particulares, sendo que o desempenho das comunidades mais

diversas não ultrapassará em magnitude o das espécies mais eficientes (Loreau & Hector 2001). Este efeito poderá resultar da maior competitividade de algumas espécies, condicionando o processo de evolução natural e, por isso, Loreau (2010) considera o efeito de amostragem (aumento da probabilidade de encontrar nas comunidades mais diversas espécies com melhor desempenho) como um caso particular do efeito de seleção (seleção de espécies com melhor desempenho).

Complementaridade funcional - o efeito de complementaridade, que resulta de interações de facilitação entre espécies ou da diferenciação de nicho, ou seja, as espécies exploram os recursos de forma complementar, pelo que o aumento da biodiversidade leva a uma utilização mais eficiente dos recursos.

Loreau & Hector (2001) propõem que os efeitos líquidos da biodiversidade podem ser estimados comparando o desempenho da comunidade com o desempenho esperado, com base na soma do desempenho individual das espécies que compõem a comunidade.

Fox (2005) argumenta que a designação de “efeito de seleção” induz em erro, uma vez que a complementaridade também condiciona a seleção natural, e designa-o como efeito de dominância. Propõe um modelo tripartido, que inclui a dominância (quando uma espécie com melhor desempenho em monoculturas domina nas policulturas excluindo competitivamente outras espécies), e divide o efeito de complementaridade em “dependente dos traços funcionais” (quando as misturas favorecem espécies com traços particulares - o que implica um efeito de seleção com equivalente no processo evolutivo e dependente da complementaridade e não da componente seleção/amostragem do modelo original de Hector & Loreau (2001) – por exemplo, quando uma espécie mais competitiva é favorecida pelo menor nicho de outra, mas não a prejudica) e complementaridade “independente dos traços funcionais” (quando o desempenho de todas as espécies é favorecido – por exemplo, quando não ocorre sobreposição de nichos).

Ambos os modelos exigem que se conheça o desempenho individual das espécies nas policulturas para o cálculo dos três efeitos: dominância/seleção, complementaridade dependente ou independente dos traços funcionais. Contudo, tal não é possível para vários parâmetros funcionais de microrganismos, como por exemplo a decomposição e a biomassa produzida. Nestas situações, pode admitir-se uma predominância do efeito de seleção/amostragem/dominância quando nas policulturas o desempenho não ultrapassa em média o das monoculturas, e um efeito de complementaridade (facilitação ou diferenciação de

nicho) quando o desempenho das policulturas ultrapassa o das monoculturas (Pascoal & Cássio 2008).

A existência de relações positivas entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas poderá não ser a norma e relações neutras, ou mesmo negativas, poderão ocorrer. Relações positivas são frequentemente observadas para alguns parâmetros, como a biomassa, mas as espécies competitivamente dominantes poderão não contribuir positivamente para outros processos (Jiang et al. 2008). Além disso, existem espécies que, apesar de pouco representadas nos ecossistemas (pouco abundantes), têm grande influência nos processos ecológicos, pois possuem traços funcionais determinantes -“espécies chave”. Mesmo quando a diversidade não afeta os processos dos ecossistemas, a variabilidade das respostas pode diminuir com o aumento da diversidade (efeito portfolio), contribuindo para a estabilidade dos processos, uma vez que a maior diversidade atenua a contribuição de espécies dominantes (Pascoal & Cássio 2008; Pascoal et al. 2010).

1.1.2. Medidas de diversidade

A unidade convencional da biodiversidade é a espécie, e continua a ser válido considerar a diversidade de espécies para avaliar a biodiversidade. Podemos, ainda, considerar a diversidade de genótipos, ou seja a diversidade intraespecífica, se considerarmos de forma abrangente a diversidade genética (Hughes et al. 2008). Assim, diferentes métricas relacionadas poderão afetar o funcionamento dos ecossistemas: riqueza, densidade (por área ou volume) e equitabilidade em espécies ou genótipos (Chiarucci et al. 2011).

Alguns estudos têm sublinhado a importância da diversidade funcional, isto é, a existência de traços que poderão ser mais relevantes para o funcionamento dos ecossistemas do que o número de espécies em si mesmo (Diaz et al. 2006; Reiss et. al. 2009). Apesar de a espécie ser, em última análise, a expressão de um genoma, têm vindo a aumentar os estudos que analisam a divergência genética, recorrendo à sequenciação de genes, ou do genoma na totalidade, e que utilizam marcadores moleculares para avaliar a diversidade de uma comunidade (King 2009; Cavender-Bares et al. 2009). Admitindo que espécies que partilham uma história evolutiva (isto é, são filogeneticamente mais próximas) têm mais traços comuns, a divergência genética poderá ser um indicador de diversidade de traços funcionais presentes numa comunidade (Woodward 2009).

O princípio é simples: a atividade das espécies nos ecossistemas é mediada pelo fenótipo e este resulta de um genótipo determinado, e a similaridade genética poderá ser um indicador de equivalência funcional (Hughes et al. 2008), havendo porém exceções resultantes da ocorrência independente de mutações ecologicamente relevantes em organismos distintos, que podem na generalidade partilhar a maioria dos genes (Cavender-Bares et al. 2009).

Existem diversos índices que avaliam a divergência genética (King 2009; Hughes et al. 2008). Numa comunidade, a divergência genética entre os genótipos/espécies presentes pode ser expressa como a soma das distâncias entre todos os genótipos (Chiarucci et al. 2011) ou pela soma das distâncias dividida pelo número de genótipos/espécies (Heemsbergen et al. 2004; Jousset et al. 2011), representando, neste caso, a divergência média da comunidade.

A combinação de diferentes medidas de diversidade poderá também ser relevante: Reiss et al. (2009) referem, por exemplo, que associar o número de espécies à existência de traços funcionais poderá ser utilizado para gerar, em experiências controladas, combinações de espécies com diferentes abundâncias relativas, em função dos seus traços funcionais, o que permitirá testar estatisticamente modelos e hipóteses relativos à influência da identidade no processo em estudo.

1.1.3. Experiências em microcosmos

Os estudos em microcosmos com microrganismos poderão contribuir para esclarecer as relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (Bell et al. 2008), apesar de alguns autores argumentarem que estas experiências são conduzidas numa escala inadequada e com comunidades demasiadamente simplificadas (Jiang et al. 2009). Apresentam em todo o caso claras vantagens (Bell et al. 2008): podem ser conduzidas ao longo de várias gerações, o que permite que se atinja um equilíbrio (pressuposto para testar modelos matemáticos); as condições nas quais decorre a experiência podem ser controladas (isto é, podem manipular-se diferentes variáveis para testar hipóteses diversas); e permitem a combinação de diferentes espécies a partir de culturas puras. Jiang et. al. (2009) apontam limitações às experiências controladas em que se manipula a diversidade biológica: como estas experiências são geralmente curtas, as comunidades podem ser consideradas imaturas e não representativas de estádios mais avançadas da sucessão que ocorre nos ecossistemas naturais. Assim, nestas experiências, o efeito positivo da complementaridade poderá ser de maior magnitude do que na natureza, uma vez que aqui poderá

ocorrer a exclusão de espécies menos competitivas, mas que possuem traços funcionais relevantes. As experiências controladas poderão ser mais informativas quando se simula a perda de espécies cujo risco de extinção é maior e cuja representatividade nos ecossistemas é menor; deverão ainda decorrer durante várias gerações, para permitir a exclusão por via de competição (Jiang et. al. 2009).

1.1.4. Efeitos da biodiversidade

As relações positivas entre diversidade interespecífica de plantas ou de algas e a produtividade dos ecossistemas estão bem documentadas (Fargione et al. 2007; Power & Cardinale 2009; Cardinale 2011), sendo este efeito atribuído sobretudo à complementaridade funcional. Por outro lado, o aumento da biomassa nestes organismos foi associado a efeitos positivos (Power & Cardinale 2009; Cardinale 2011) ou negativos (Zhang & Zhang 2006; Fargione et al. 2007) noutros parâmetros funcionais, podendo a identidade das espécies da comunidade alterar as tendências observadas. Por outro lado, as experiências em microcosmos podem não refletir os efeitos da perda de biodiversidade que ocorre na natureza, uma vez que as espécies são muitas vezes escolhidas de forma aleatória (Bracken et al. 2008). A relação positiva entre o número de espécies e a produção de biomassa foi confirmada noutros grupos taxonómicos, podendo depender da abundância relativa e da densidade (Mckie et al 2008). Além disso, a manipulação simultânea da diversidade em diferentes níveis tróficos também é crítica para conferir realismo às experiências que testam o efeito da perda de biodiversidade (Reiss et al. 2010), e experiências que analisaram o efeito da diversidade interespecífica, num dado nível trófico e em diferentes níveis das cadeias tróficas, mostraram que as interações entre os diversos níveis podem afetar as relações entre a biodiversidade e os processos (Costantini & Rossi 2010; Wagg et al 2011). Nas interações entre diferentes níveis tróficos, verificou-se que a identidade das espécies foi, em geral, mais decisiva nas tendências observadas do que o número de espécies (Hossain & Sugiyama 2011; Wilkinson et al. 2011; De Deyn et al. 2011).

Em estudos recentes verificou-se que o aumento da diversidade intraespecífica conduzia ao aumento da biomassa, com efeitos de magnitude semelhante aos da diversidade interespecífica (Cook-Patton et al. 2011). Contudo, a identidade dos genótipos parece ser muito relevante

(Crutsinger et al. 2009), o que poderá resultar em efeitos positivos, nulos ou negativos (Wilkinson et al. 2010; Duffy 2010; Hargrave et al. 2011).

A diversidade funcional foi correlacionada positivamente com o número de espécies e com a divergência genética (Cadotte et al. 2008; Flynn et al. 2011). Apesar da diversidade funcional poder relacionar-se positivamente com os parâmetros funcionais (Romanuk et al. 2010), isso pode não se verificar com o aumento da diversidade noutros níveis, nomeadamente com o aumento do número de espécies (Heemsbergen et al. 2004) ou do número de genótipos (Jousset et al. 2011a; Jousset et al. 2011b), sendo por isso necessário esclarecer quais os traços funcionais que representam os impactos reais nos ecossistemas. Por exemplo, a perda de espécies especialistas pode ter mais impacto num processo do ecossistema, mas a perda de espécies generalistas terá efeitos desproporcionalmente maiores (Gravel et al. 2011).

1.2. Estudos com hifomicetos aquáticos no contexto da decomposição da matéria orgânica

1.2.1. Importância dos hifomicetos aquáticos

Os hifomicetos aquáticos são um grupo polifilético de fungos, que partilham a capacidade de esporular abundantemente em ambientes aquáticos e de colonizar os detritos vegetais (folhas e galhos) provenientes da vegetação ribeirinha (Bärlocher 2005). Os hifomicetos aquáticos participam de forma decisiva no processo de decomposição dos detritos vegetais, que consiste num conjunto de transformações bióticas e abióticas que resultam na formação de biomassa (fúngica, bacteriana e animal), dióxido de carbono e outras substâncias minerais, matéria orgânica dissolvida e matéria orgânica particulada fina (Gessner et al. 2007). A atividade dos hifomicetos aquáticos depende de variáveis ambientais (como o oxigénio, pH, temperatura e nutrientes inorgânicos) e também das interações bióticas que se estabelecem entre eles e as comunidades bacterianas e de macroinvertebrados (Suberkropp 1998). O micélio produzido nas folhas contribui para a decomposição e providencia alimento para os macroinvertebrados detritívoros que se alimentam das próprias folhas condicionadas ou da matéria orgânica libertada em consequência da ação dos fungos (Bärlocher 2005). Além disso, a diversidade de fungos aquáticos é afetada por alterações resultantes da atividade humana, nomeadamente as relacionadas com a exploração

mineira (Sridhar et al. 2001, 2005), a eutrofização (Pascoal et al. 2005) e mudanças na vegetação ribeirinha (Lecerf & Chauvet 2008). Alguns autores sugerem que a taxa de decomposição e, sobretudo, a taxa de esporulação, poderão ser bons indicadores da qualidade ecológica dos ecossistemas aquáticos (Pascoal et al. 2003; Lecerf & Chauvet 2008).

1.2.2. Diversidade inter e intraespecífica de hifomicetos aquáticos

Os hifomicetos aquáticos incluem pelo menos 320 espécies (Gessner et al. 2007). Por exemplo, Pascoal et al. (2005), identificaram 113 taxa (com base na morfologia dos esporos assexuados), em 5 rios e ribeiros do noroeste de Portugal. No entanto, a diversidade de hifomicetos aquáticos, estimada por métodos moleculares, poderá exceder a estimada por métodos que dependem da capacidade dos fungos de esporularem (Bärlocher 2010). Por outro lado, a diversidade dos hifomicetos aquáticos nos rios pode ser elevada, mas há evidências de que 90% dos conídeos libertados das folhas em decomposição nos rios pertencem a 1-4 espécies (Sridhar et al. 2005).

Seena et al. (2010a) comparando as sequências ITS do DNA de 91 isolados de hifomicetos aquáticos, pertencentes a 19 espécies, estimaram uma divergência média entre as espécies de 23% e uma divergência intraespecífica não superior a 2%. Além disso, a análise das sequências ITS de diferentes estirpes de *Articulospora tetracladia* sugere que esta região permitirá também distinguir variedades da mesma espécie (Seena et al. 2010b). Foi também observada diversidade intraespecífica em *Tetrachaetum elegans* (Laitung et al. 2004) e *Tetracladium marchallianum* (Anderson & Shearer 2011) usando, respetivamente, AFLP (amplified fragment length polymorphism) e microssatélites de locus polimórficos.

1.3. O sistema decompositor como modelo para estudar as relações biodiversidade-funcionamento dos ecossistemas

Cerca de 100 gigatoneladas de matéria orgânica são produzidas pelas plantas anualmente e, desta matéria orgânica, 90% é decomposta por microrganismos (Gessner et al., 2010). Em rios e ribeiros, a massa de folha que pode entrar neste habitat é tipicamente da ordem de 500 g de massa seca/m²/ano, podendo superar os 2000 g/m²/ano (Gessner et al. 2007). A taxa de

decomposição via fungos aquáticos poderá variar entre 0,6 e 16 mg/g de folhada/dia e a produção secundária de biomassa de fungos varia habitualmente entre 16 a 193 g/m²/ano e corresponde a mais de 90% da biomassa dos microrganismos nas folhas em decomposição (Gessner et al. 2007).

A decomposição de folhas pode ser faseada em várias etapas envolvendo a ação de microrganismos especializados (McGuire & Treseder, 2010). Por outro lado, os detritos vegetais apresentam heterogeneidade física e química (Gressner et al. 2010). Estes dois fatores suportam a hipótese de que poderá existir complementaridade (por mecanismos de diferenciação de nicho e de facilitação) no processo de decomposição por fungos aquáticos. No entanto, parece haver considerável redundância resultante da existência enzimas semelhantes em diferentes taxa (Gessner et al. 2010; McGuire & Treseder, 2010). Contudo, quando a diversidade é reduzida, o impacto da perda de espécies poderá ser mais importante – Nielsen et al. (2011), referem que relações positivas entre a biodiversidade e a decomposição ocorrem com mais frequência quando estão envolvidas menos que dez espécies. Esta tendência pode ser explicada por um efeito positivo da biodiversidade quando as comunidades são pouco diversas, mas pode também estar relacionada com o incremento de interações negativas em comunidades mais diversas (Gessner et al.; 2010; Nielsen et al., 2011).

Hättenschwiler et al. (2011) sugerem que a diversidade funcional dos microrganismos decompositores deverá envolver a avaliação da sua capacidade funcional em contextos específicos, como por exemplo as taxas de crescimento em diferentes substratos. Catalogar os microrganismos em diferentes grupos funcionais poderá servir de critério na planificação de experiências em microcosmos, criando comunidades mais ou menos complementares. Por exemplo McGuire et al. (2010) verificaram que fungos terrestres respondiam de forma diferente a substratos distintos e ainda que a diferenciação na utilização de recursos se correlacionava com a diferenciação genética.

1.4. Estudos em microcosmos com hifomicetos aquáticos

As experiências em microcosmos e os estudos de campo revelaram que a diversidade dos hifomicetos aquáticos afeta a decomposição dos detritos vegetais e outros processos relacionados, como a biomassa dos fungos e a sua reprodução (Pascoal & Cássio 2008). Contudo, tem-se

verificado existir redundância considerável entre as espécies para garantir o funcionamento dos ecossistemas. Além disso, a diversidade de fungos aquáticos poderá contrariar o impacto de alterações ambientais, servindo como uma garantia para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Pascoal & Cássio 2008).

Quando se manipulou o número de espécies de hifomicetos aquáticos, verificou-se que a um aumento da diversidade correspondia uma tendência para o aumento da decomposição de folhada, mas o efeito da identidade das espécies foi mais determinante para o processo (Bärcholer & Corkum 2003; Duarte et al. 2006). A biomassa produzida pelos hifomicetos aquáticos foi mais elevada quando se aumentou o número de espécies (Duarte et al. 2006; Pascoal et al. 2010; Fernandes et al. 2011), e os efeitos positivos da biodiversidade na esporulação poderão ter sido contrariados por interações antagonistas (Treton et al. 2004; Pascoal et al. 2010). Em situações de stresse os efeitos positivos da biodiversidade no processo da decomposição foram atenuados, mas traços funcionais específicos e intraespecíficos alteraram a resposta das comunidades (Pascoal et al. 2010; Fernandes et al. 2011). Mesmo quando não se verificou um aumento do desempenho das comunidades mais diversas, verificou-se uma diminuição significativa na variabilidade dos processos em níveis mais altos de diversidade – efeito portfolio - em consequência da menor influência de espécies com desempenhos extremos nas comunidades com maior diversidade (Dang et al. 2005; Pascoal et al. 2010). Isto poderá ser relevante em termos ecológicos, uma vez que comunidades mais ricas terão, assim, menores flutuações em resposta às alterações ambientais.

2. Metodologia

2.1. Caracterização dos fungos

Os fungos foram isolados de rios portugueses e estão depositados na coleção de microrganismos do Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Departamento de Biologia da Universidade do Minho: A1 – *Articulospora tetraccladia* Ingold UMB-058.01; A2 – *Articulospora tetraccladia* UMB-022.01; A3 – *Articulospora tetraccladia* UMB-60.01; B – *Lunulospora curvula* Ingold UMB-305.05; C – *Tricladium splendens* Ingold UMB-068.01; D – *Anguillospora filiformis* Greath. UMB-232.02; E – *Varicosporium elodeae* W. Kegel UMB-171.01; F - *Tetraccladium marchallianum* De Wild. UMB-239.02.

A tabela I indica a origem dos fungos utilizados neste estudo, o substrato do qual foram isolados e o código do Genbank (Seena et al. 2010a; Seena et al. 2010b).

Tabela I – Referência dos isolados de hifomicetos aquáticos, localização do rio de onde foram isolados, substrato de origem e código do GenBank - E1 e E5 – Rio Este; Sj – Ribeira de São João do Campo; Pe -.Rio Pelhe

Taxon	Referência	Localização	Substrato amostrado	Código do GenBank
A1 - <i>Articulospora tetraccladia</i>	UMB-058.01	E5 (41°30'N 8°27'W)	Folhas	
A2 - <i>Articulospora tetraccladia</i>	UMB-022.01	E1 (41°34'N 8°19'W)	Espuma	
A3 - <i>Articulospora tetraccladia</i>	UMB-60.01	E5 (41°30'N 8°27'W)	Folhas	
B – <i>Lunulospora curvula</i>	UMB-305.05	E1 (41°34'N 8°19'W)	Água do rio	GQ411320
C – <i>Tricladium splendens</i>	UMB-068.01	Sj (41°45'N 8°11'W)	Espuma	GQ411349
D – <i>Anguillospora filiformis</i>	UMB-232.02	E1 (41°34'N 8°19'W)	Folhas	GQ4411259
E – <i>Varicosporium elodeae</i>	UMB-171.01	E1 (41°34'N 8°19'W)	Espuma	GQ411276
F - <i>Tetraccladium marchallianum</i>	UMB-239.01	Pe (41°24'N 8°30'W)	Folhas	GQ411299

A figura 1 apresenta imagens dos conídeos/esporos assexuados das espécies utilizadas neste estudo.

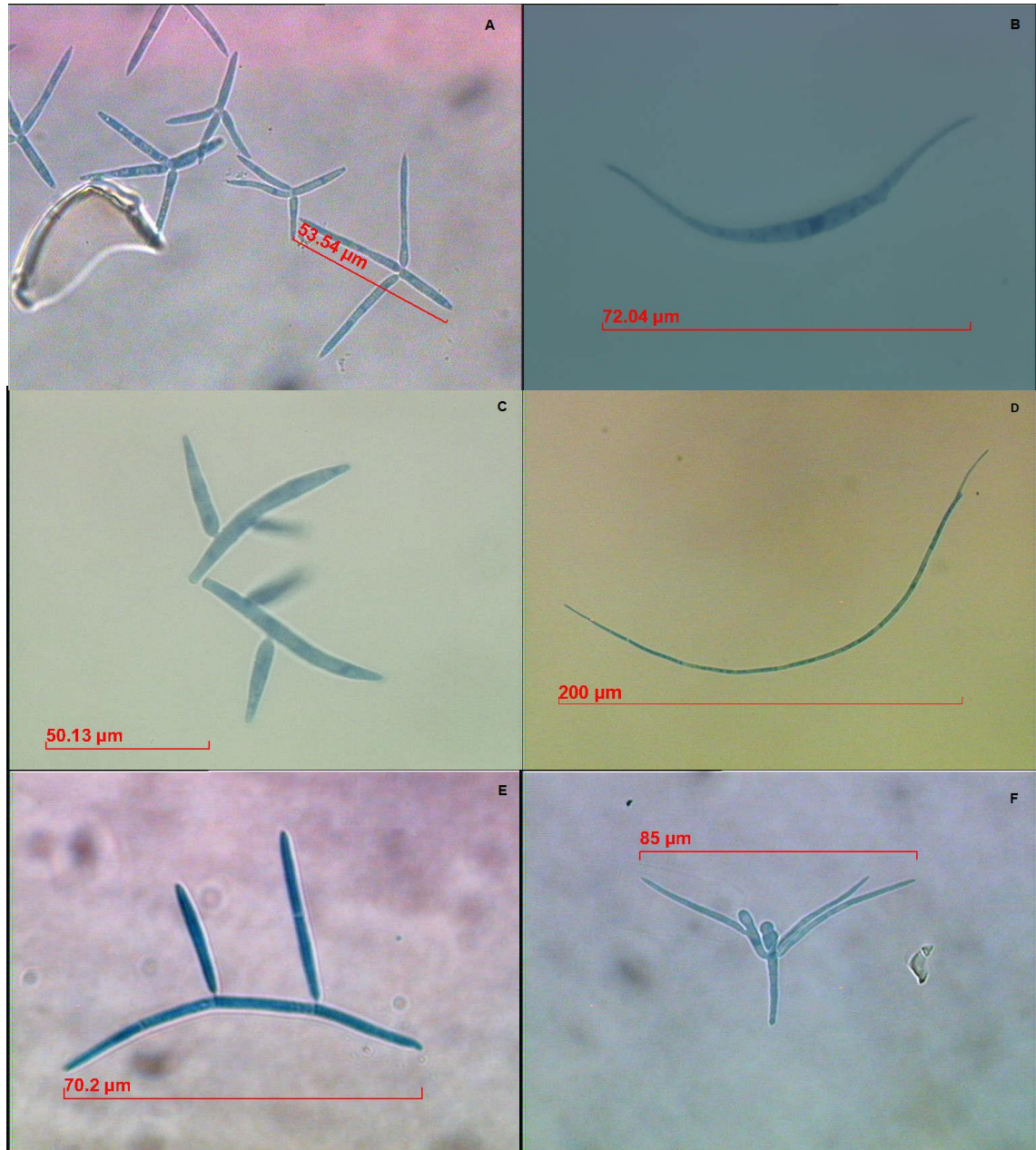


Figura 1– Esporos dos hifomicetos: A – *Articulospora tetracladia* Ingold; B – *Lunulospora curvula* Ingold; C – *Tricladium splendens* Ingold; D – *Anguillospora filiformis* Greath.; E – *Varicosporium elodeae* W. Kegel ; F - *Tetracladium marchallianum* De Wild. (Fotografias cedidas pelo Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Departamento de Biologia da Universidade do Minho).

Os isolados utilizados neste estudo são filogeneticamente distintos, como revelam as árvores filogenéticas apresentadas nas figuras 2 e 3 e os dados da tabela II, que se referem à percentagem de divergência genética - sequência das regiões ITS.

Tabela II – Percentagem de divergência genética dos hifomicetos aquáticos baseada nas sequências das regiões ITS (Seena et al. 2010a)

Taxon	A1	A2	A3	B	C	D	E
A1 - <i>Articulospora tetracladia</i>	0						
A2 - <i>Articulospora tetracladia</i>	1,8						
A3 - <i>Articulospora tetracladia</i>	1,8	1,8					
B – <i>Lunulospora curvula</i>	35,6	35,6	35,6				
C – <i>Tricladium splendens</i>	23,0	23,0	23,0	37,7			
D – <i>Anguillospora filiformis</i>	7,4	7,4	7,4	38,7	22,8		
E – <i>Varicosporium elodeae</i>	4,7	4,7	4,7	36,2	22,2	6,8	
F - <i>Tetraccladium marchallianum</i>	17,4	17,4	17,4	37,8	24,3	21,5	17,3

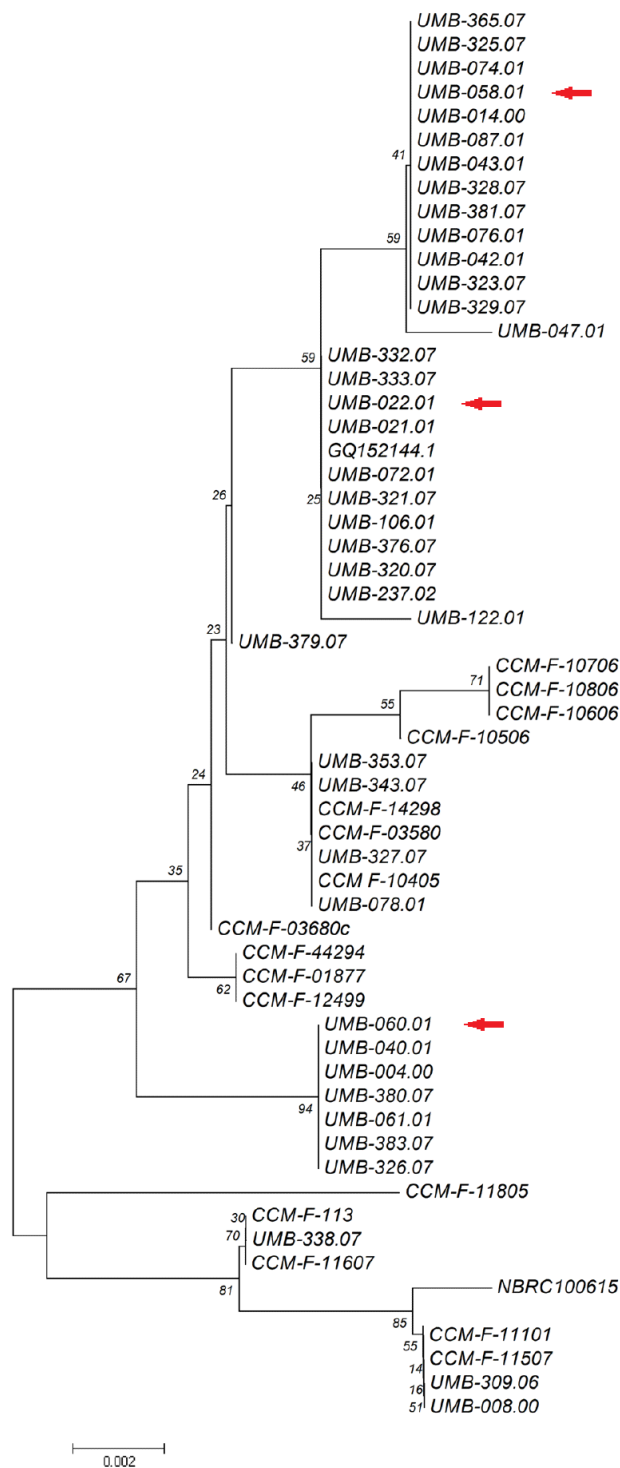


Figura 2 – Árvore filogenética representando as distâncias entre as diferentes estirpes de *A. tetradia* utilizadas neste estudo (assinaladas com uma seta), com base na sequência das regiões ITS (Seena et al. 2010b).

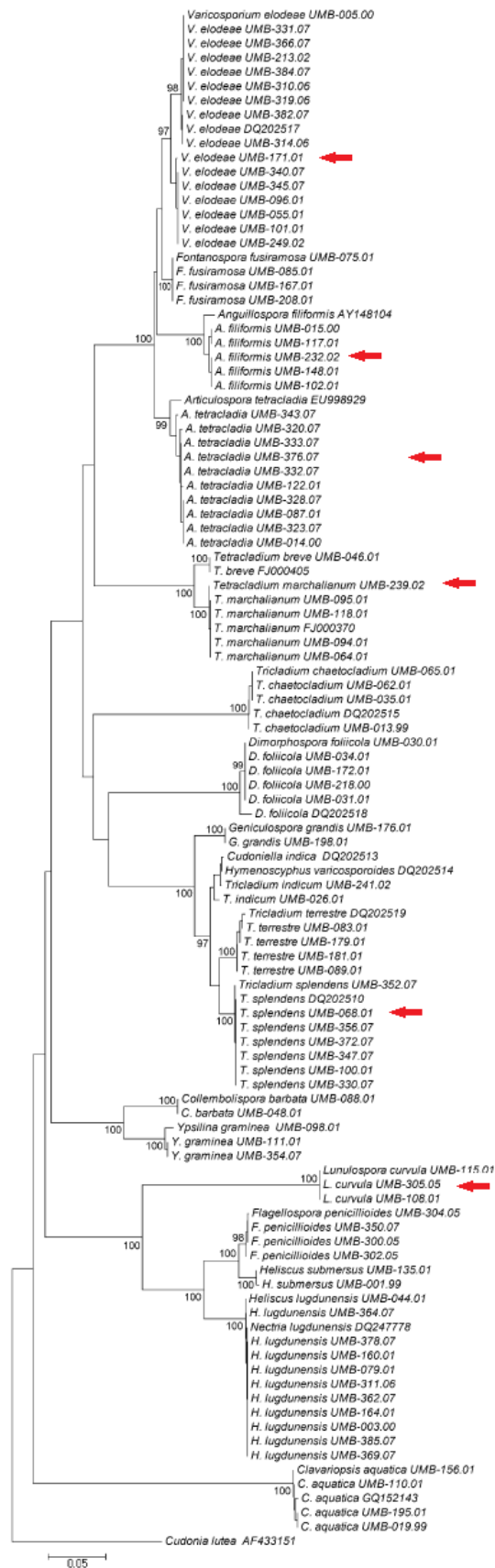


Figura 3 – Árvore filogenética representando as distâncias entre as diferentes estirpes e espécies utilizadas neste trabalho (assinaladas com uma seta) com base na sequência das regiões ITS (Seena et al. 2010a).

2.2. Preparação dos microcosmos

A experiência decorreu em microcosmos, desenhados de forma a simular o processo de decomposição de folhas em cursos de água doce promovido por hifomicetos, que consistiram em frascos Erlenmeyer contendo água do Gerês, folhas e inóculo fúngico.

Folhas de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (amieiro), recolhidas em 2001 e secas à temperatura ambiente, foram lixiviadas em água desionizada por dois dias. Destas folhas cortaram-se discos com 12 mm de diâmetro. Setenta e seis conjuntos de 30 discos foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C. Água mineral (resíduo seco 34,0±4 mg/l; Sílica 9,6±2 mg/l; HCO₃⁻ 8,0±0,8 mg/l; Cl⁻ 4,2±0,4 mg/l; SO₄²⁻ 1,0±0,2 mg/l; Na⁺ 4,1±0,4 mg/l; Ca²⁺ 1,3±0,3 mg/l; K⁺ 0,6±0,1 mg/l; pH 6,0) foi autoclavada por 20 minutos a 120°C. Numa câmara de fluxo laminar foi adicionado, a cada microcosmo, um volume de 70 ml de água, um conjunto de 30 discos das folhas e o inóculo fúngico apropriado.

Culturas puras dos isolados de fungos foram preparadas em placas de Petri com aproximadamente 7 ml de extrato de malte a 1%.

Os microcosmos foram inoculados com combinações de 1, 3 e 6 espécies e com 1 ou 3 estirpes de *A. tetracladia* de acordo com o esquema que se apresenta na tabela III. Foram preparados triplicados de cada tratamento.

A inoculação foi realizada com discos de agar, com 5 mm de diâmetro, retirados da periferia das colónias com 28 a 30 dias de crescimento. O inóculo totalizou em todos os microcosmos 6 discos de agar. Nas monoculturas inocularam-se 6 discos de agar de cada espécie ou estirpe, nas triculturas 2 discos de cada espécie e 2/3 de cada estirpe, quando se combinaram as 3 estirpes de *A. tetracladia*, e, nas hexaculturas, o inóculo correspondeu a 1 disco de agar de cada espécie e 1/3 de disco de agar de cada estirpe de *A. tetracladia*, no microcosmo com as três estirpes. Foram preparados 72 microcosmos (3 réplicas para cada uma das combinações, de acordo com a tabela II) mais 4 controlos, com água e folhas, mas sem inóculo fúngico, para estimar o peso final sem ação dos fungos e para averiguar da ocorrência de eventuais contaminações.

Os microcosmos foram colocados numa incubadora orbital com agitação e temperatura constantes durante 35 dias (15 °C, 140 rpm; Certomat BS 3, Melsungen, Alemanha) e sob luz artificial (24 horas). A água dos microcosmos foi substituída a cada 7 dias, para remover os

metabolitos excretados pelos fungos. A água dos microcosmos foi recolhida para garrafas de plástico contendo formaldeído a 2% para fixar os esporos e Triton X - 100 (40µl de 15%), para evitar a agregação dos esporos entre si e à superfície da garrafa.

Tabela III: Desenho experimental hierarquizado para testar o efeito do número de espécies, identidade da espécie, número de estirpes e identidade da estirpe na decomposição da matéria folhada, produção de biomassa e taxa de esporulação dos fungos.

Número de espécies	Identidade da espécie	Número de estirpes	Identidade da estirpe
1	A	1	A1
	B		A2
	C		A3
	D		
	E		
	F		
3	ABC	1	A1BC
			A2BC
			A3BC
	ADE	3	A1A2A3BC
		1	A1DE
			A2DE
	ABF	3	A1A2A3DE
		1	A1BF
			A2BF
6	ABCDEF	3	A3BF
			A1A2A3BF
		1	A1BCDEF
			A2BCDEF
			A3BCDEF
		3	A1A2A3BCDEF

2.3. Determinação da perda de massa foliar

O material foliar de cada réplica foi liofilizado após a experiência e pesado ($\pm 0,001$ g). Para estimar a taxa de decomposição foi determinada a massa de folha consumida considerando-se a média do peso das folhas nos controlos como zero mg de folha consumida e subtraiu-se a este valor o peso final das folhas de cada microcosmo.

2.4. Quantificação da biomassa de fungos nas folhas em decomposição

A biomassa de fungos metabolicamente ativos foi estimada por quantificação da concentração do ergosterol presente na membrana plasmática dos fungos, de acordo com o descrito por Gessner (2005). Resumidamente: seis a sete discos de material foliar de cada réplica foram pesados após liofilização e colocados em KOH-metanol (0,8%) durante 30 minutos a 80°C,

para extrair os lípidos. O extrato lipídico foi purificado por extração em fase sólida e o ergosterol foi eluído com isopropanol. O ergosterol foi quantificado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC; Beckmann Gold System, Brea, CA, EUA), usando uma coluna LiChrospher RP-18 (25 por 0,4 cm) e metanol como solvente (1,4 mL/min; 33 °C). O pico de ergosterol foi detectado a 282 nm. Uma curva padrão com ergosterol, dissolvido em isopropanol, foi utilizada para estimar a concentração de ergosterol nas amostras.

. Os resultados foram convertidos em biomassa, usando um fator de conversão de 5,5 mg/g de massa seca de fungo (Gessner & Chauvet, 1993) e expressos em mg de biomassa fúngica/g de massa seca de folha.

2.5. Avaliação da taxa de esporulação dos fungos

Amostras de suspensões de esporos foram filtradas através de membranas (5 µm de tamanho de poro – Millipore, Billerica, MA) e os esporos retidos foram corados com uma solução de azul de algodão em ácido láctico (0,05% p/v). As membranas foram examinadas ao microscópio ótico (microscópio binocular VWR, ampliação 400X) para identificar as espécies de fungos e quantificar os esporos com base na sua morfologia (Romani et al. 2009). Contaram-se pelo menos 300 esporos para cada réplica. Os resultados foram expressos em número de esporos/mg de folha residual/dia.

2.6. Tratamento estatístico dos dados

A partir dos dados da tabela II foi calculada a divergência genética média em cada tratamento, que corresponde à soma da divergência entre todos os pares de espécies/estirpes da mistura, dividida pelo número de combinações duplas possíveis na comunidade (Heemsbergen et al. 2004; Jousset et al. 2011a; Jousset et al. 2011b), de acordo com a equação:

$$Div = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=i}^n GD_{ij}}{\frac{n!}{2!(n-2)!}}$$

Em que: Div é a divergência genética média da comunidade, GD_{ij} a divergência genética entre pares de espécies/estirpes e n o número total de genótipos presentes na comunidade.

Análises de variância hierarquizada (nested ANOVA) foram usadas para testar o efeito do número de espécies e da identidade da espécie (nested no número de espécies), do número de genótipos e da identidade genética (nested no número de genótipos) em todos os parâmetros funcionais: decomposição foliar, produção de biomassa e reprodução dos fungos. O efeito da divergência genética média nos três parâmetros funcionais foi testado por uma análise de variância unifatorial (One-Way ANOVA). Quando necessário os dados foram logaritmizados (biomassa e esporulação), para obter uma distribuição normal.

Para detetar os tratamentos que apresentavam diferenças significativas para cada um dos parâmetros avaliados, foram realizados testes post-hoc - teste Fisher LSD.

O efeito da diversidade dos fungos nas funções ecológicas foi ainda avaliado comparando os efeitos observados nas culturas mistas com os esperados, com base na soma ponderada dos resultados observados nas monoculturas (Duarte et al. 2006; Pascoal et al. 2010). Para esse efeito, realizou-se um teste t comparando a diferença entre os valores observados e esperados (hipótese nula: observado-esperado=0). Foram usadas regressões lineares, polinomiais ou hiperbólicas para descrever as relações entre os valores observados, ou as diferenças entre os valores observados e esperados, e 1) número de espécies, 2) número de genótipos e 3) divergência genética média (%).

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 6.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

3. Resultados

3.1. Decomposição das folhas

A Figura 4 apresenta os resultados relativos ao consumo de folha por hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies e combinações de 1 ou 3 estirpes de *Articulospora tetracladia*, até um total de 8 genótipos.

Após os 35 dias durante os quais decorreu a experiência de decomposição de folhada, a quantidade de folha consumida pelos hifomicetos aquáticos nas monoculturas variou entre 21,81 mg, na monocultura de *Anguillospora filiformis* (D), e 63,24 mg na monocultura de *Tetracladium marchallianum* (F). Nos microcosmos com 3 espécies a perda de massa das folhas variou entre 28,80 mg (A1BC) e 57,40 mg (A1A2A3BC) e nos microcosmos com 6 espécies variou entre 21,86 mg (A1A2A3BCDEF) e 60,60 mg (A3BCDEF).

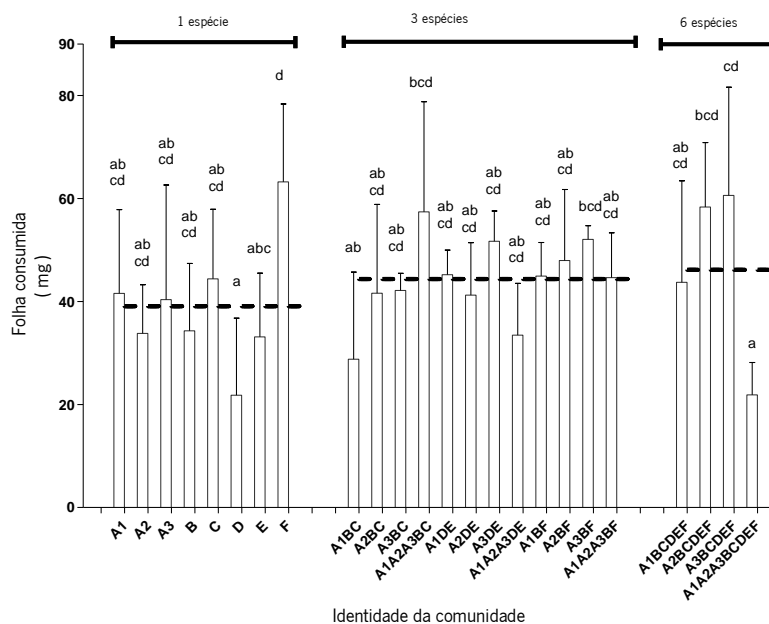


Figura 4 - Consumo de folha por hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies e 1 ou 3 estirpes de *Articulospora tetracladia*, até um total de 8 genótipos. A linha horizontal a tracejado indica o valor médio para as monoculturas e para as policulturas com 3 e 6 espécies. A1 – *A. tetracladia* UMB-058.01; A2 – *A. tetracladia* UMB-022.01; A3 – *A. tetracladia* UMB-60.01; B – *Lunulospora curvula*; C – *Tricladium splendens*; D – *Anguillospora filiformis*; E – *Varicosporium elodeae* e F – *Tetracladium marchallianum*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (post-hoc teste – Fisher LSD; $p=0,01$). Média e desvio padrão.

A tabela IV apresenta os resultados da nested ANOVA relativos ao efeito do número de espécies e da identidade das espécies presentes na comunidade no consumo de folha por hifomicetos aquáticos. O consumo de folha pelos hifomicetos aquáticos não foi significativamente afetado pelo número de espécies, nem pela identidade de espécies ($p > 0,05$) e foi estatisticamente equivalente em todos as combinações de espécies, com exceção da monocultura com *Anguillospora filiformis*, em que foi inferior, e da monocultura com *Tetracladium marchallianum*, em que foi superior (testes post hoc Fisher LSD com $p = 0,01$).

A regressão linear relacionando o número de espécies com a quantidade de folha consumida (Figura 5a) revelou uma tendência positiva, mas não significativa ($y = 1,4827x + 38,669$, $r^2 = 0,0257$, $p = 0,1817$).

Os efeitos do número de genótipos e da identidade genética da comunidade no consumo de folha por hifomicetos aquáticos, através de uma nested ANOVA, são apresentados na tabela V. O consumo de folha por hifomicetos não foi afetado pela identidade genética da comunidade, mas foi significativamente afetado pelo número de genótipos da comunidade (tabela V). A comunidade com 8 genótipos (6 espécies e 3 estirpes) foi estatisticamente equivalente à monocultura com menor consumo de folha - *A. filiformes* (Fisher post-hoc, $p < 0,01$ - Figura 4). Nas combinações com 3, 5, ou 6 genótipos o consumo de folha foi estatisticamente inferior ou equivalente ao da monocultura com maior consumo de folha - *T. marchallianum* (Testes post-hoc Fisher LSD, $p = 0,01$). Nas 3 monoculturas com genótipos distintos de *A. tetracladia* o consumo de folha foi estatisticamente equivalente (Testes post-hoc Fisher LSD, $p = 0,01$ - Figura 4).

A Figura 5b mostra a quantidade de folha consumida pelos hifomicetos aquáticos em função do número de genótipos na comunidade. Uma função polinomial foi a que traduziu melhor a relação entre as duas variáveis, mostrando um aumento da folha consumida até 3 a 5 genótipos seguido de uma diminuição ($y = -1,0133x^2 + 8,4237x + 30,43$, $r^2 = 0,0841$).

O efeito da divergência genética média da comunidade no consumo de folha por hifomicetos aquáticos foi significativo (Tabela VI). A comunidade com uma divergência genética média de 16,7%, correspondendo à combinação de 8 genótipos (A1A2A3BCDEF), consumiu significativamente menos folha, e as comunidades com divergência genética média de 23,6% (A1-3BCDEF – combinações com 6 genótipos) consumiram significativamente mais folha (testes post-hoc Fisher LSD com $p = 0,01$).

A relação entre a quantidade de folha consumida e a divergência genética média da comunidade revelou uma tendência linear positiva, mas não significativa ($y=0,2024x+39,974$, $r^2=0,0282$, $p=0,1614$ – Figura 5c).

Tabela IV – Nested ANOVA do efeito do número de espécies (1, 3 ou 6) e da identidade das espécies (nested no número de espécies) na quantidade de folha consumida pela comunidade de hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Folha consumida				
Nº de espécies	2	231,5	1,0348	0,3615
Identidade das espécies (nº de espécies)	7	439,6	1,9651	0,0746

Tabela V – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos (1, 3, 5, 6 ou 8) e da identidade genética (nested no número de genótipos) na quantidade de folha consumida pela comunidade de hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Folha consumida				
Nº de genótipos	4	726,57	3,8699	0,0085
Identidade genética (nº de genótipos)	19	291,43	1,5522	0,1110

Tabela VI – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na quantidade de folha consumida pelos hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Folha consumida				
Divergência genética média na comunidade	8	546,74	2,6276	0,0152

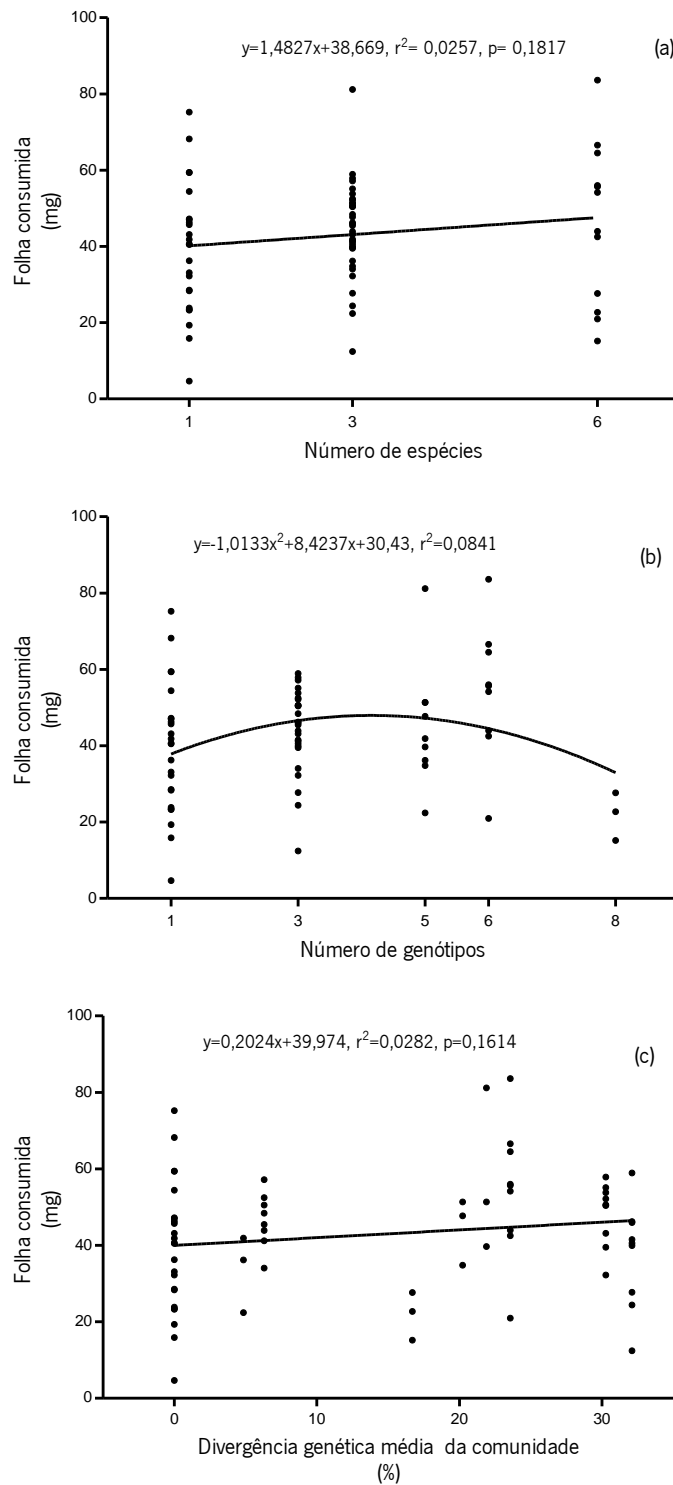


Figura 5 – Consumo de folha por hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies (a) com 1 a 8 genótipos (b) e com diferentes níveis de divergência genética média (c).

O efeito do número de espécies no consumo de folha, avaliado como a diferença entre os resultados observados em policulturas e os esperados (com base na soma ponderada do consumo da massa foliar pelas monoculturas), está representado na Figura 6a. A diferença entre os resultados observados e esperados foi significativamente superior a zero, quando consideramos as policulturas como um todo (teste t: $t=2,680$, $p=0,0087$) ou separadamente (testes t: $t=2,976$, $p=0,004$, 3 espécies; $t=2,309$, $p=0,025$, 6 espécies).

Projetando a diferença entre os resultados observados e esperados em função do número de genótipos (Figura 6b), verificou-se que a linha de tendência que melhor representou a relação entre as variáveis correspondeu a uma função polinomial ($y=-2,5505x^2+24,352x-45,347$, $r^2=0,1582$). Para todos os níveis de genótipos as diferenças entre os valores observados e esperados, relativos ao consumo de folha, foram significativamente diferentes de zero (testes t, $p<0,005$). Nas combinações com 3, 5 e 6 genótipos os valores observados foram superiores aos esperados e na combinação com 8 genótipos foram inferiores aos esperados.

A projeção dos resultados relativos à diferença entre os valores observados e esperados de perda de massa foliar em função da divergência genética média está representada na Figura 6c. A regressão linear foi negativa, mas não significativa ($y=-0,3034x+12,44$, $r^2=0,0388$, $p=0,1844$). As diferenças entre os valores observados e esperados foram i) significativamente superiores a zero nas comunidades com divergência genética média de 6,3% (ADE), 21,9% (A1A2A3BC), 23,6% (ABCDEF) e 30,3% (ABF); ii) inferiores a zero na comunidade com divergência genética média 16,7% (A1A2A3BCDEF) e iii) não diferiram de zero nas comunidades com divergência genética média de 4,9% (A1A2A3DE), 20,2% (A1A2A3BF) e 32,1% (ABC) – testes t com diferenças significativas para $p<0,05$.

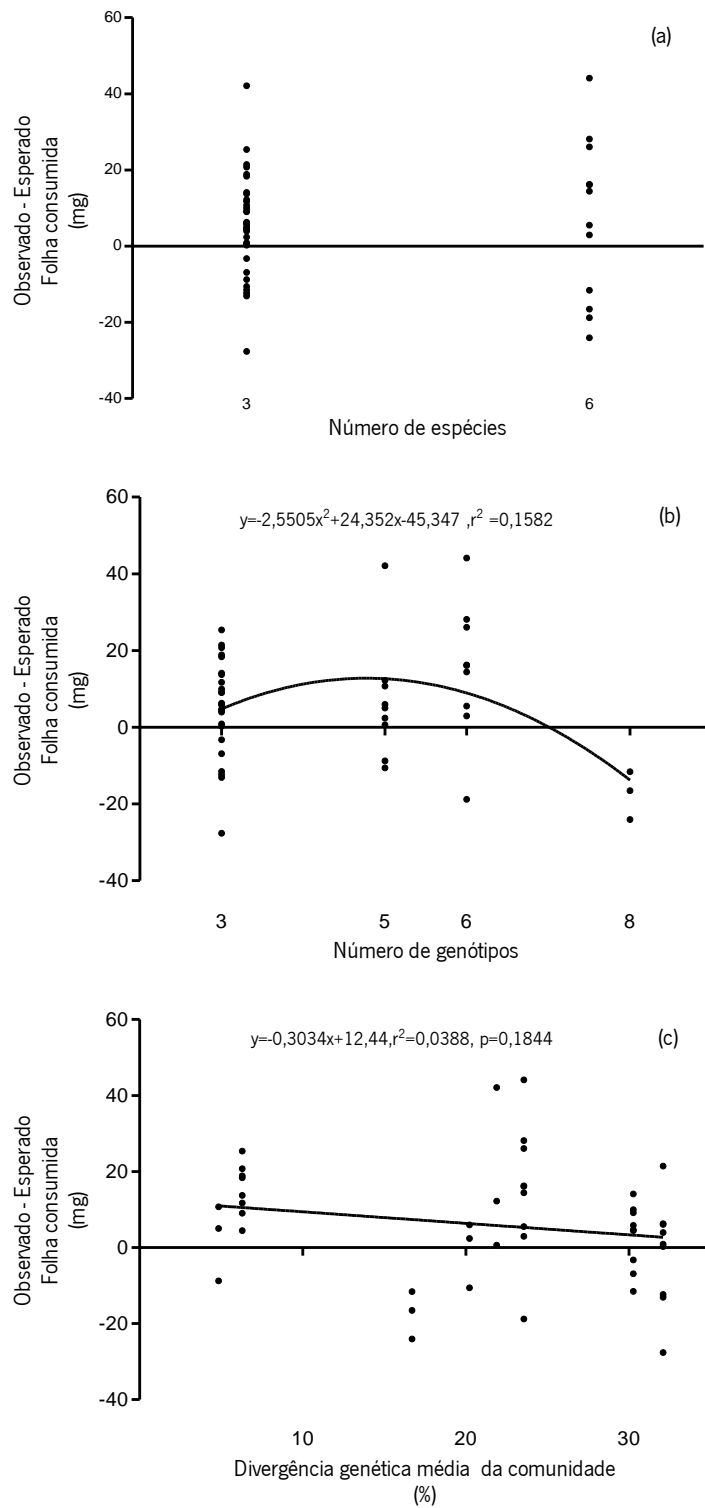


Figura 6 – Efeito do número de espécies (a), do número de genótipos (b) e da divergência genética média das comunidades de hifomicetos aquáticos (c) no consumo de folha, avaliado pela diferença entre os resultados observados em policulturas e os esperados calculados a partir da soma ponderada do consumo de folha pelas monoculturas.

3.2. Biomassa de fungos

A Figura 7 apresenta os resultados relativos à biomassa de hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies de hifomicetos aquáticos e combinações de 1 ou 3 estirpes de *A. tetracladia*, até um total de 8 genótipos.

A biomassa de hifomicetos aquáticos nas monoculturas variou entre 19,55 mg/g de folha residual, na monocultura com *A. filiformes* (D), e 65,30 mg/g de folha residual na monocultura com *T. marchallianum* (F). Nos microcosmos com 3 espécies a biomassa de hifomicetos aquáticos variou entre 69,24 (A1DE) e 112,48 mg/g (A3BC) e nos microcosmos com 6 espécies variou entre 65,21 (A3BCDEF) e 93,31 mg/g (A1BCDEF).

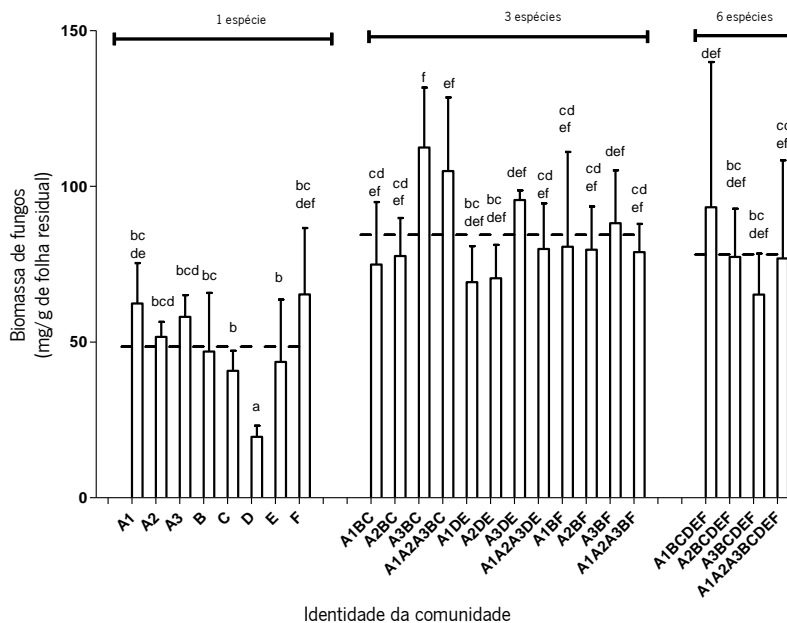


Figura 7 - Biomassa de fungos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies de hifomicetos aquáticos e combinações de 1 ou 3 estirpes de *A. tetracladia*, até um total de 8 genótipos. A linha horizontal a tracejado indica o valor médio para as monoculturas e para as policulturas com 3 e 6 espécies. A1 – *A. tetracladia* UMB-058.01; A2 – *A. tetracladia* UMB-022.01; A3 – *A. tetracladia* UMB-60.01; B – *L. curvula*; C – *T. splendens*; D – *A. filiformis*; E – *V. elodeae* e F – *T. marchallianum*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (post-hoc teste – Fisher LSD; $p=0,01$). Média e desvio padrão.

A tabela VII apresenta os resultados da nested ANOVA relativos ao efeito do número e da identidade das espécies presentes na biomassa de fungos, produzida pelas comunidades associadas às folhas em decomposição. A biomassa de fungos foi significativamente afetada pelo número de espécies e pela identidade de espécies – Tabela VII.

A biomassa de fungos nos microcosmos com *A. filiformes* foi estatisticamente inferior à de todos os outros microcosmos; as monoculturas com *L. curvula*, *T. splendens* e *V. elodeae* produziram uma biomassa de fungos significativamente inferior às monoculturas com *A. tetracladia* e *T. marchallianum* e a todas as policulturas; as monoculturas com *T. marchallianum* apresentaram níveis de biomassa de fungos superiores aos das monoculturas com *A. tetracladia*; as comunidades com mais biomassa de fungos foram as policulturas com 3 espécies nas combinações ABC e ABF, seguidas das policulturas com 3 e 6 espécies, respetivamente nas combinações ADE e ABCDEF (testes post-hoc Fisher LSD com $p=0,01$).

Uma função hiperbólica (assumindo que para zero espécies a biomassa de fungos é nula) foi a que traduziu melhor a relação entre o número de espécies e a biomassa produzida, mostrando uma saturação da biomassa a partir de 3 espécies ($(y=103,6.x)/(0,97+x)$, $r^2=0,3342$) – (Figura 8a).

A tabela VIII apresenta os resultados da nested ANOVA relativos ao efeito do número de genótipos e da identidade genética da comunidade na biomassa de fungos. O efeito do número de genótipos e da identidade genética da comunidade na biomassa de fungos foi significativo (Tabela VII). As monoculturas com as estirpes de *A. tetracladia* UMB-022.01 (A2) e UMB-60.01 (A3) apresentaram valores de biomassa de fungos estatisticamente equivalentes entre si e inferiores à monocultura com o genótipo de *A. tetracladia* UMB-058.01 (A1); as comunidades com 1 genótipo produziram menos biomassa do que as comunidades com 3 ou mais genótipos, com exceção das monoculturas com *T. marchallianum*, que apresentaram valores de biomassa estatisticamente equivalentes aos das comunidades A1DE, A2DE e A3BCDEF (testes post-hoc Fisher LSD com $p=0,01$).

A Figura 8b projeta a relação entre o número de genótipos da comunidade e a biomassa de fungos e mostra um aumento da biomassa de fungos até 3 genótipos seguido de uma saturação. A função que melhor traduziu esta relação foi do tipo hiperbólico (assumindo para zero genótipos um valor de biomassa de fungos nulo) – $(y=101,1.x)/(0,95+x)$, $r^2=0,3488$.

A divergência genética média da comunidade afetou significativamente a produção de biomassa de fungos (Tabela IX). A biomassa de fungos foi menor nas monoculturas (0% de divergência genética média) em relação a todas as policulturas; todas as comunidades com divergência genética maior que zero tiveram valores de biomassa equivalentes, com exceção da

comunidade com 16,7% de divergência genética média (com 8 genótipos) que teve um valor de biomassa inferior ao de todas as restantes comunidades (testes post-hoc Fisher LSD com $p=0,01$).

A relação entre a biomassa de fungos e a divergência genética média da comunidade pôde ser melhor descrita por uma função hiperbólica (assumindo para $x=0$ o valor médio de biomassa nas monoculturas) e mostrou um aumento da biomassa de fungos até, aproximadamente, 10% de divergência genética média, seguido de uma saturação ($y=(38,15.x)/(1,76+x)+48,55$, $r^2=0,4003$).

Tabela VII – Nested ANOVA do efeito do número de espécies (1, 2 ou 3) e da identidade das espécies (nested no número de espécies) na biomassa produzida pela comunidade de fungos.

	Df	MS	F	P
Biomassa de fungos				
Nº de espécies	2	3,102	47,41	<0,0001
Identidade das espécies (nº de espécies)	7	0,455	6,96	<0,0001

Tabela VIII – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos (1, 2, 3, 5, 6 ou 8) e da identidade genética (nested no número de genótipos) na biomassa produzida pela comunidade de fungos.

	Df	MS	F	P
Biomassa de fungos				
Nº de genótipos	4	1,3662	19,80	0,0001
Identidade genética (nº de genótipos)	19	0,2059	2,98	0,0013

Tabela IX – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na biomassa produzida pela comunidade de fungos.

	Df	MS	F	P
Biomassa de fungos				
Divergência genética média na comunidade	8	0,7119	6,304	<0,0001

A diferença entre a biomassa observada nas policulturas e a esperada (com base na soma ponderada da biomassa dos fungos nas monoculturas), em função do número de espécies, está representada na Figura 9a. A diferença entre os resultados observados e esperados foi superior a zero, considerando as policulturas como um todo (teste t: $t=11,02$, $p<0,0001$) ou separadamente (teste t: $t= 12,36$, $p<0,0001$, 3 espécies; $t= 8,44$, $p<0,0001$, 6 espécies).

Projetando a diferença entre os valores de biomassa observados e esperados em função do número de genótipos (Figura 9b) verificou-se que a linha de tendência que melhor representou a relação entre as variáveis foi uma função linear ($y=-0,18x+35,67$, $r^2=0,0002$, $p=0,9299$). Para todos os níveis de genótipos, as diferenças entre os valores observados e esperados foram significativamente superiores a zero (testes t, $p<0,0001$).

A diferença entre a biomassa observada e esperada em função da divergência genética média, representada na Figura 9c, foi traduzida por uma regressão linear não significativa ($y=-0,14x+38,04$, $r^2=0,0041$, $p=0,6732$). Em todos os níveis de divergência genética maiores do que zero, a diferença entre a biomassa observada e esperada foi superior a zero (testes t, $p<0,0001$).

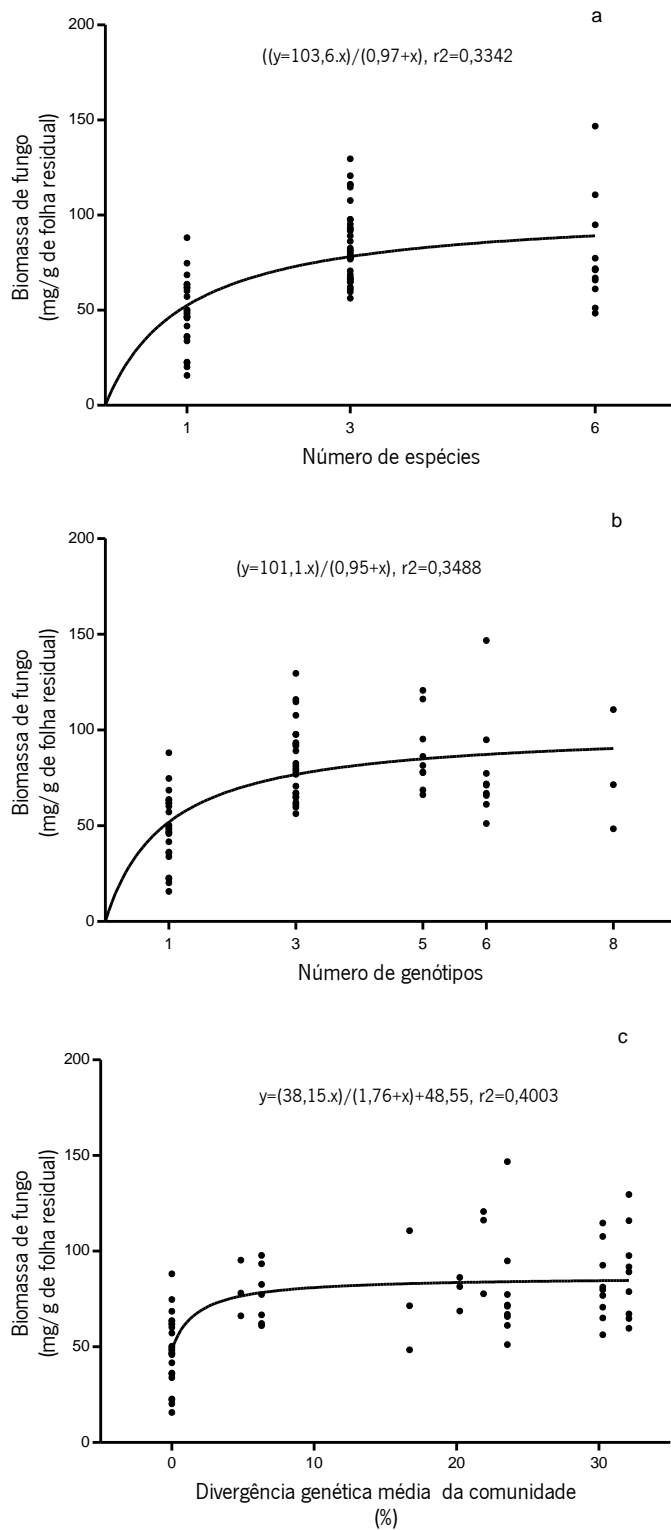


Figura 8 – Biomassa produzida pelos hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies (a) com 1 a 8 genótipos (b) e com diferentes níveis de divergência genética média (c).

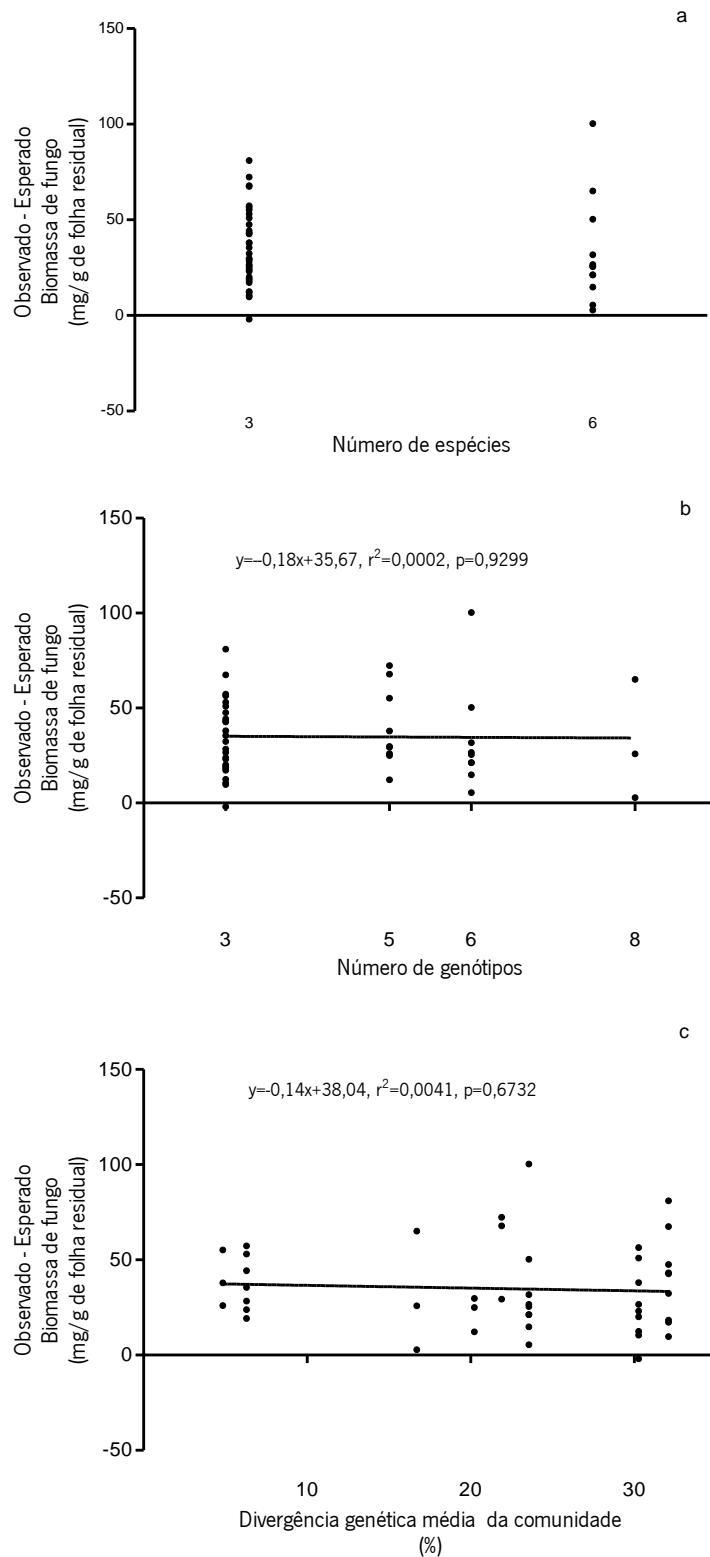


Figura 9 – Efeito do número de espécies (a), do número de genótipos (b) e da divergência genética média das comunidades de hifomicetos aquáticos (c) na biomassa de fungos, avaliado pela diferença entre os resultados observados em policulturas e os esperados calculados a partir da soma ponderada da biomassa produzida pelas monoculturas.

3.3. Esporulação

A Figura 10a apresenta os resultados relativos à esporulação de hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies de hifomicetos aquáticos e combinações de 1 ou 3 estirpes e *A. tetracladia*, até um total de 8 genótipos.

Nas monoculturas, a taxa de esporulação variou entre 193,0 esporos/dia/mg de folha residual para *T. marshallianum*, e 988,3 esporos/dia/mg de folha residual para *A. tetracladia* UMB-058.01 (A1). Nas policulturas com 3 espécies, a taxa de esporulação variou entre 65,1 esporos/dia/mg de folha residual (A3BC) e 665,7 esporos/dia/mg de folha residual (A1BF), enquanto que nas policulturas com 6 espécies variou entre 36,4 (A1A2A3BCDEF) e 159,1 esporos/dia/mg de folha residual (A1BCDEF). Nos microcosmos com uma única estirpe de *A. tetracladia*, *A. tetracladia* UMB-058.01 (A1) foi a que apresentou maior taxa de esporulação, seguida de *A. tetracladia* UMB-022.01 (A2) e *A. tetracladia* UMB-60.01 (A3) – (Figura 10)

A média da taxa de esporulação das policulturas com 3 espécies superou a média das monoculturas (considerando também as monoculturas em que não ocorreu esporulação) e as médias da taxa de esporulação das monoculturas e das comunidades com 3 espécies superaram as taxas de esporulação médias das comunidades com 6 espécies (Testes post-hoc Fisher LSD, com $p=0,01$). Nenhuma policultura superou a monocultura com maior taxa de esporulação (Testes post-hoc Fisher LSD, com $p=0,01$).

A Figura 10b apresenta a contribuição relativa das espécies de hifomicetos aquáticos para a esporulação total da comunidade.

A. tetracladia esporulou em todos os microcosmos em que estava presente (29,7 a 988,3 esporos/dia/mg de folha residual), assim com *T. marshallianum* (2,4 a 193,0 esporos/dia/mg de folha residual); *L. curvula* (0 a 237,9 esporos/dia/mg de folha residual) esporulou apenas nos microcosmos A1BC, A2BC, A1BF, A2BF, A3BF, A1A2A3BF, A1BCDEF e A1A2A3BCDEF. As outras espécies não esporularam em nenhum microcosmo. *A. tetracladia* foi a espécie que mais esporulou e que mais contribuiu para o número total de esporos produzidos em todos os microcosmos (Figura 10b).

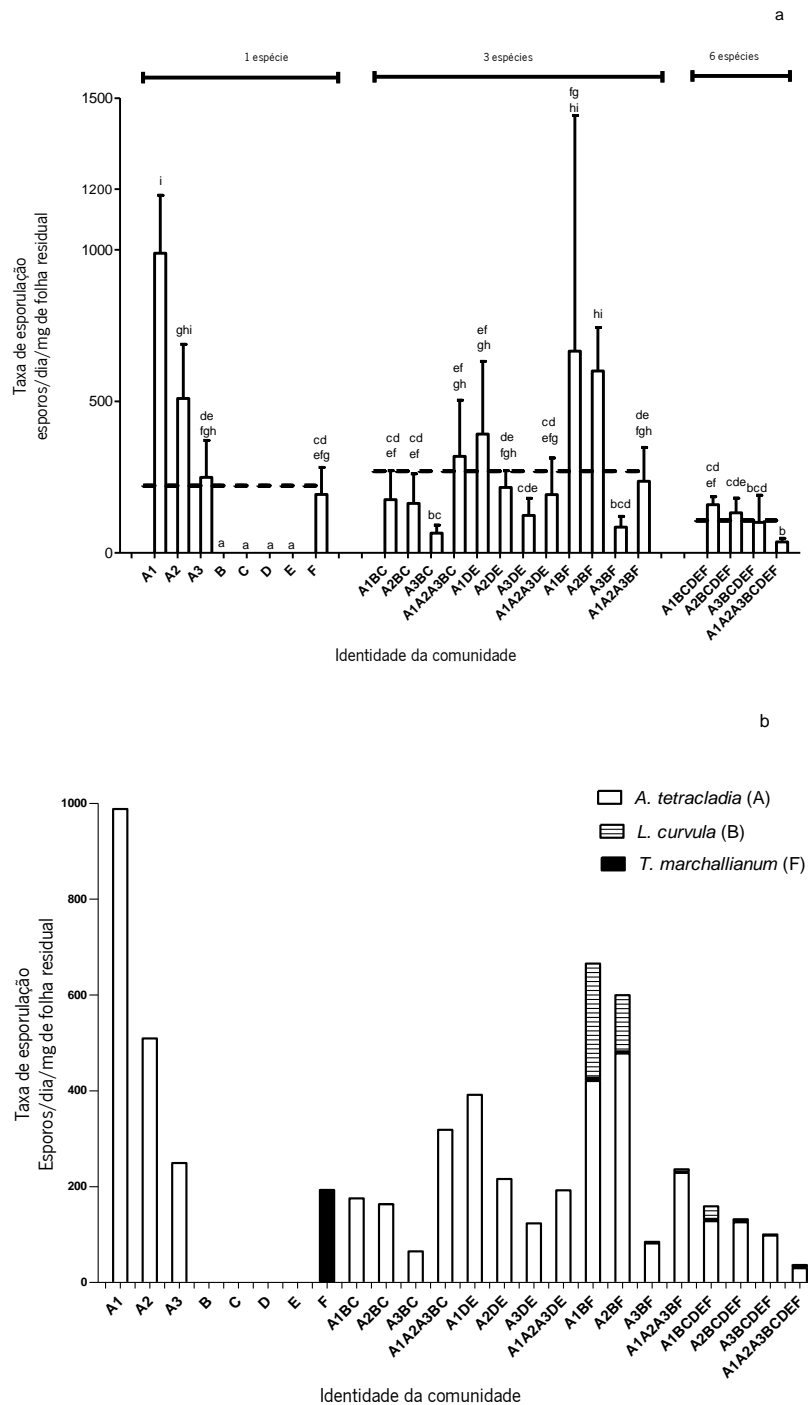


Figura 10 – Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos presentes em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies e 1 ou 3 estirpes de *Articulospora tetracladia*, até um total de 8 genótipos. A linha horizontal a tracejado indica o valor médio para as monoculturas e para as policulturas com 3 e 6 espécies. A1 – *A. tetracladia* UMB-058.01; A2 – *A. tetracladia* UMB-022.01; A3 – *A. tetracladia* UMB-60.01; B – *Lunulospora curvula*; C – *Tricladium splendens*; D – *Anguillospora filiformis*; E – *Varicosporium elodeae* e F – *Tetracladium marchallianum*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (post-hoc teste – Fisher LSD; $p=0,01$). Média e desvio padrão.

A tabela X apresenta os resultados da nested ANOVA relativos ao efeito do número de espécies e da identidade de espécies presentes na comunidade na taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos. A taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos foi significativamente afetada pelo número de espécies e pela identidade de espécies (Tabela X).

A regressão linear relacionando o número de espécies com a taxa de esporulação de hifomicetos aquáticos (Figura 11a) mostrou um declive negativo, mas não é significativo ($y = -24,69x + 303,35$, $r^2 = 0,0311$, $p = 0,2235$).

A taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos foi afetada significativamente pelo número de genótipos e pela identidade genética da comunidade (Tabela XI). As taxas de esporulação das comunidades com 8 e 6 genótipos não diferiram entre si, mas foram inferiores à das outras comunidades, com exceção das monoculturas em que não ocorreu esporulação (testes post-hoc Fisher LSD com $p = 0,01$).

A Figura 11b mostra a taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos em função do número de genótipos. Verificou-se uma diminuição da esporulação com o aumento do número de genótipos, mas o ajuste a uma função linear não foi significativo ($y = -20,58x + 298,55$, $r^2 = 0,0207$, $p = 0,2275$).

O efeito da divergência genética média da comunidade na taxa de esporulação de hifomicetos aquáticos foi significativo (Tabela XII). As monoculturas (0% de divergência genética média) diferiram estatisticamente das policulturas (Testes post hoc Fisher LSD com $p = 0,01$).

A regressão linear entre a esporulação total e a divergência genética média da comunidade não foi significativa ($y = 0,39x + 227,92$, $r^2 = 0,0003$, $p = 0,8842$; Figura 11c).

Tabela X – Nested ANOVA do efeito do número de espécies (1, 3 ou 6) e da identidade das espécies (nested no número de espécies) na taxa de esporulação das comunidades de hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Taxa de esporulação				
Nº de espécies	2	73,9521	148,389	<0,01
Identidade das espécies da comunidade (nº de espécies)	7	30,7630	61,728	<0,01

Tabela XI – Nested ANOVA do efeito do número de genótipos (1, 3, 5, 6 ou 8) e da identidade genética (nested no número de espécies) na taxa de esporulação das comunidades de hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Taxa de esporulação				
Nº de genótipos	4	19,721	78,937	<0,01
Identidade genética (nº de espécies)	19	12,155	48,651	<0,01

Tabela XII – One-Way ANOVA do efeito da divergência genética média da comunidade na taxa de esporulação das comunidades de hifomicetos aquáticos.

	Df	MS	F	P
Taxa de esporulação				
Divergência genética média na comunidade	8	10,345	2,7261	0,0120

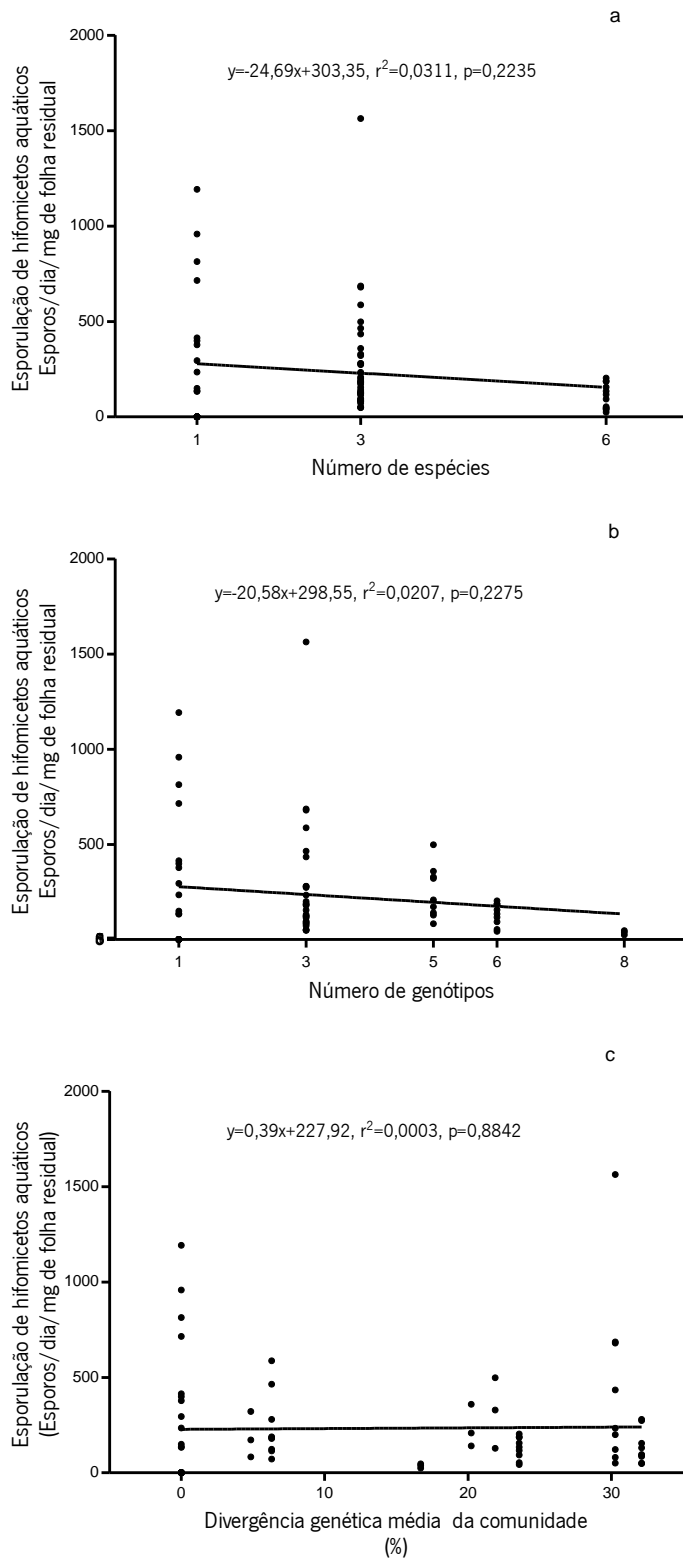


Figura 11 – Taxa de esporulação dos hifomicetos aquáticos em monoculturas e policulturas contendo 3 e 6 espécies (a) 1 a 8 genótipos (b) e com diferentes níveis de divergência genética média (c).

A diferença entre a taxa de esporulação observada nas policulturas e a esperada (com base na soma ponderada da taxa de esporulação em monoculturas), em função do número de espécies, está representada na Figura 12a. A diferença entre os resultados observados e esperados não foi significativamente superior a zero, quando consideramos as policulturas como um todo (teste t: $t=1,4999$, $p = 0,1370$), ou separadamente (testes t: $t=1,840$, $p=0,0733$, 3 espécies; $t=-0,1746$, $p=0,8620$, 6 espécies).

A diferença entre a esporulação observada e esperada em função do número de genótipos (Figura 12b) diminuiu com o aumento do número de genótipos, mas a regressão linear não foi significativa ($y=-12,52x+85,62$, $r^2=0,0174$, $p=0,3710$). As diferenças foram positivas para as comunidade com 5 genótipos (teste $t=2,7788$, $p=0,0075$) e 6 genótipos (teste $t=2,2086$, $p=0,0314$), mas negativas para comunidades com 8 genótipos (teste $t=-54,9745$, $p<0,01$).

Os resultados relativos à diferença entre as taxas de esporulação observadas e esperadas em função da divergência genética média das comunidades estão representados na figura 12c. Detetaram-se diferenças positivas para os níveis de divergência genética média de 6,3%, ADE, (teste $t=2,8217$, $p=0,0076$), 20,2%, A1A2A3BF, (teste $t=2,5432$, $p=0,142$), 21,9%, A1A2A3BC, (teste $t=5,5897$, $p<0,0001$), 23,6%, ABCDEF, (teste $t=2,2086$, $p=0,031$) e 30,3%, ABF, (teste $t=4,0008$, $p=0,0002$). Por outro lado, detetaram-se diferenças negativas para níveis de divergência genética de 16,7%, A1A2A3BCDEF, (teste $t=-54,9745$, $p<0,01$) e 32,1%, ABC, (teste $t=-4,3184$, $p<0,0001$). Não se observou uma relação linear significativa entre as taxas de esporulação observadas e esperadas e a divergência genética média das comunidades ($y=-0,043x+33,22$, $r^2<0,0001$, $p=0,9843$).

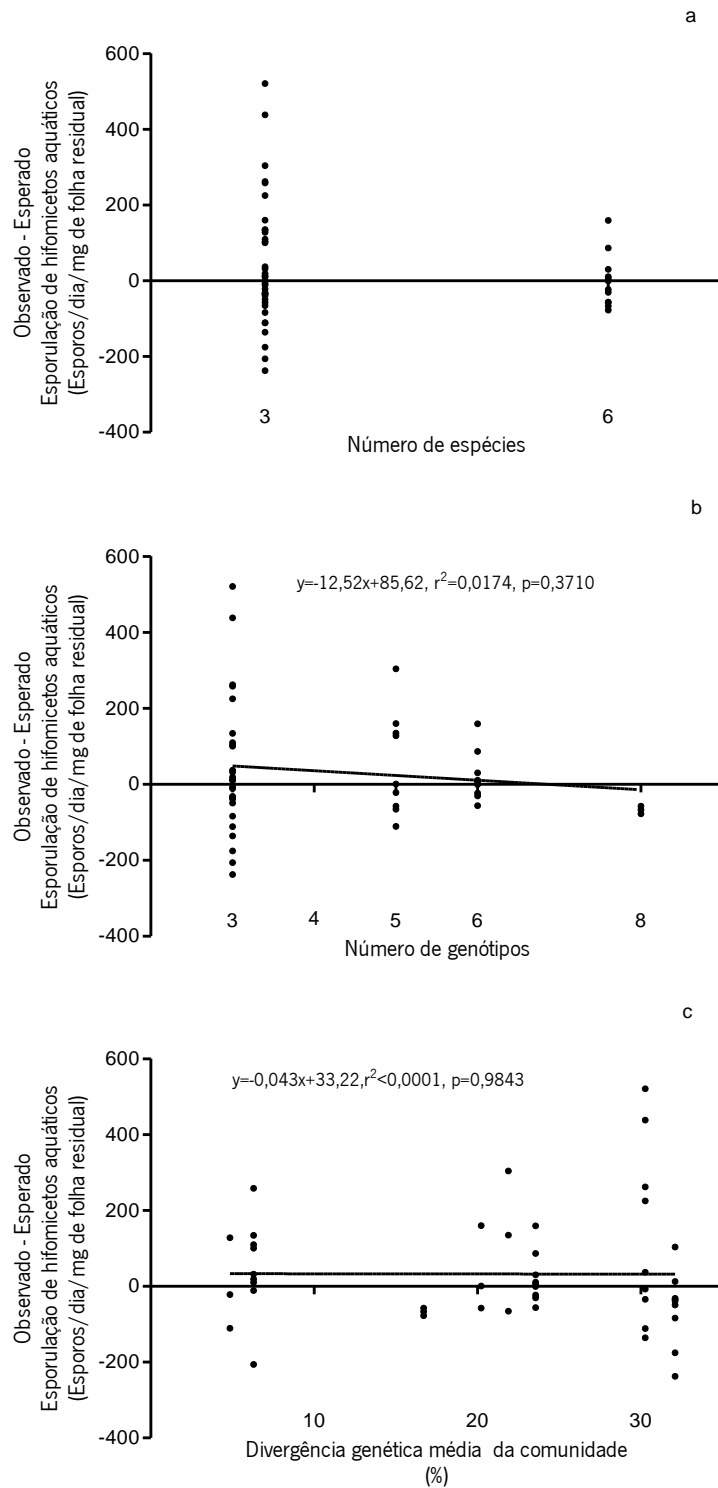


Figura 12 – Efeito do número de espécies (a), do número de genótipos (b) e da divergência genética média das comunidades de hifomicetos aquáticos (c) na taxa de esporulação, avaliado pela diferença entre os resultados observados em policulturas e os esperados calculados a partir da soma ponderada da taxa de esporulação nas monoculturas.

4. Discussão

Este estudo avaliou o efeito de três medidas da diversidade de fungos aquáticos – o número de espécies, o número de genótipos (incluindo 3 estirpes de uma mesma espécie) e a divergência genética das comunidades - em três parâmetros funcionais: a decomposição de folha, a produção de biomassa de fungos e o seu potencial reprodutor.

Os três parâmetros funcionais analisados não responderam de forma semelhante ao aumento da diversidade e as três medidas de diversidade avaliadas não refletiram exatamente os mesmos padrões, apesar de haver algum paralelismo: em geral, o aumento da diversidade teve um efeito positivo nas funções examinadas, mas, a partir de determinados níveis de diversidade das comunidades, verificou-se ausência de resposta ou mesmo inibição nos processos avaliados.

Foi detetado um efeito positivo, embora não significativo, do aumento do número de espécies de hifomicetos aquáticos na decomposição da folha. Este resultado pode ser explicado por um efeito de amostragem (Loreau & Hector 2001), uma vez que o desempenho das policulturas não ultrapassou o das monoculturas de maior rendimento. Estudos anteriores com hifomicetos aquáticos também detetaram um efeito positivo, mas não significativo, do número de espécies, sendo o efeito da identidade das espécies mais decisivo para o processo (Bärlocher & Corkum 2003; Duarte et al. 2006; Pascoal et al. 2010; Fernandes et al. 2011). No nosso estudo, o efeito da identidade das espécies de hifomicetos aquáticos presentes nas comunidades não afetou significativamente a decomposição da folha. No entanto, ao contrário dos estudos anteriores com hifomicetos aquáticos, uma espécie estava presente em todas as policulturas (*Articulospora tetracladia*), e, assim, o efeito da identidade das espécies presentes na comunidade poderá ter sido atenuado.

Por outro lado, foi observado um efeito significativo do número de genótipos e da divergência genética da comunidade na decomposição. Num estudo anterior foi detetado um efeito positivo da diversidade intraespecífica na libertação de dióxido de carbono (Wilkinson et al. 2010). No nosso estudo também se verificou um efeito positivo da diversidade na decomposição da folha; contudo, nas combinações com mais genótipos, o efeito da diversidade de hifomicetos aquáticos na decomposição de folha foi negativo. Também a diferença entre os resultados observados para a decomposição da folha em policulturas e os esperados, com base na decomposição pelas monoculturas constituintes da comunidade, foi positiva (i.e. superior a zero), mas diminuiu com o

aumento da divergência genética. Assim, os nossos resultados sugerem que o aumento da diversidade da comunidade de hifomicetos aquáticos, a nível de genótipos e de divergência genética, poderá corresponder a um enfraquecimento das interações de complementaridade entre as espécies durante o processo de decomposição. No processo de decomposição microbiana, os mecanismos de complementaridade poderão ser devidos a interações de facilitação entre as espécies ou à diferenciação de nicho (Tiunov & Scheu 2005; Costantini & Rossi 2010). A decomposição da folhada é um processo que se desenrola em etapas sucessivas, em que os produtos resultantes da degradação do substrato por um determinado microrganismo se tornam substratos para outros microrganismos decompositores, facilitando a utilização dos recursos por outros decompositores do mesmo nível trófico. Assim, a decomposição da matéria orgânica poderá ser assegurada por microrganismos funcionalmente distintos, com diferentes perfis enzimáticos e taxas metabólicas (Tiunov & Scheu 2005; McGuire & Treseder 2010). Apesar de nos hifomicetos aquáticos a generalidade das enzimas capazes de promover a decomposição do material vegetal estarem presentes (Gressner et al. 2010), as taxas metabólicas dos fungos poderão diferir o suficiente para que, em comunidades mais diversas, por aumento do número de genótipos e da divergência genética, este processo sequencial de facilitação possa não ser tão eficiente, pois a acumulação e processamento de subprodutos poderão não ocorrer ao mesmo ritmo, resultando não apenas na saturação, mas mesmo na diminuição da taxa de decomposição.

À semelhança de outros estudos com hifomicetos aquáticos (Duarte et al. 2006; Pascoal et al. 2010; Fernandes et al. 2011), foi claramente detetado um efeito positivo da diversidade na biomassa de fungos. Este resultado poderá ser explicado por um efeito de complementaridade (Loreau & Hector 2001), uma vez que as policulturas apresentaram valores de biomassa significativamente superiores aos das monoculturas. As 3 medidas da diversidade analisadas neste estudo (número de espécies, número de genótipos e divergência genética da comunidade) mostraram que o aumento da diversidade conduz a efeitos positivos na biomassa produzida pelos fungos aquáticos, sobretudo a níveis baixos de diversidade, e sugerem redundância para níveis de biodiversidade mais elevados. Isto pode ser explicado pelo modelo da diferenciação de nichos (Tilman 2000): à maior diversidade corresponde maior produtividade, porque as espécies ocupam nichos complementares, no entanto, à medida que a diversidade aumenta os nichos começam a sobrepor-se, até se atingir um nível de saturação em que todos os nichos estão ocupados. Além disso, os fungos podem produzir substâncias inibitórias que limitam o crescimento de outros

fungos (Treton et al. 2004; Gessner et al. 2010). Nas comunidades naturais de fungos aquáticos, o crescimento de hifas de diferentes espécies, em contacto íntimo, sugere que poderá ocorrer a diluição de eventuais antibióticos em meio aquático (Gessner et al. 2010). Contudo, nesta experiência a água dos microcosmos foi apenas substituída semanalmente e poderão ter-se acumulado metabolitos inibitórios, limitando o crescimento e contrariando efeitos positivos de complementaridade no crescimento e produtividade dos fungos. Na natureza, e nos ecossistemas aquáticos, será, contudo, mais provável a ocorrência de interações positivas e o efeito destes mecanismos antagonistas será reduzido (Gessner et al. 2010).

A identidade das espécies e dos genótipos da comunidade tiveram um efeito significativo na biomassa produzida pelos hifomicetos aquáticos, o que apoia os resultados de estudos anteriores com estes organismos (Duarte et al. 2006; Pascoal et al. 2010; Fernandes et al. 2011) ou com outros grupos taxonómicos, enfatizando a importância da identidade das espécies (Hector & Loreau 2001; Cardinale 2002) e da identidade genotípica, incluindo a nível intraespecífico (Crutsinger et al. 2009; Duffy 2010), para as funções ecológicas.

Os resultados relativos à esporulação têm de ser interpretados com cuidado, uma vez que 3 espécies não esporularam em monocultura, o que pode ajudar a explicar o efeito significativo da identidade das espécies nas taxas de esporulação das comunidades. Houve uma diminuição da esporulação com o aumento do número de espécies e de genótipos, mas este efeito não foi significativo. Contudo, o aumento da divergência genética das comunidades teve um efeito médio positivo, apesar dos efeitos diferirem consoante o nível de divergência genética da comunidade. Estando *A. tetracladia* presente em todas as comunidades, e sendo a espécie que mais contribuiu para a esporulação, os efeitos da diversidade na esporulação terão sido sobretudo os efeitos na esporulação desta espécie. Verificou-se também um efeito significativo da identidade genética da comunidade na esporulação, refletindo as diferenças significativas das taxas de esporulação entre estirpes de *A. tetracladia*.

O evidente e forte efeito positivo da diversidade na produção de biomassa de fungos sugere que a complementaridade poderá ser mais importante na produção de biomassa do que na decomposição. No nosso estudo, a produção de biomassa relacionou-se positivamente com a taxa de decomposição (Figura 14). Assim, nas comunidades mais diversas, os efeitos positivos da complementaridade na produção de biomassa poderão ter sido atenuados, traduzindo-se numa menor taxa de decomposição destas comunidades. Também, a menor eficiência de mecanismos

de facilitação, por aumento do número de genótipos e interações, poderá ter reduzido as taxas de decomposição, o que se terá traduzido numa menor produção de biomassa. Por outro lado, a taxa de esporulação terá sido determinada pela identidade da estirpe de *A. tetracladia* presente no microcosmo, o que se refletiu na idiosincrasia do efeito da divergência genética da comunidade (Figura 13c) e na dispersão dos valores da esporulação em função da taxa de decomposição.

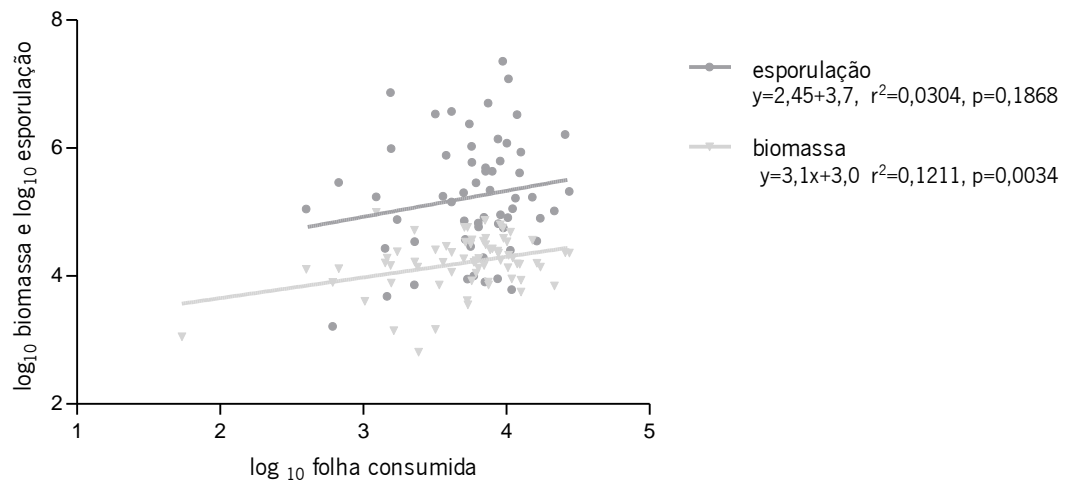


Figura 14 – Regressão linear entre a folha consumida pelos hifomicetos aquáticos e as taxas de esporulação e a biomassa produzida pelos hifomicetos aquáticos. Os dados referem-se às policulturas e às monoculturas, com exceção das monoculturas que não esporularam.

As 3 medidas de diversidade analisadas neste estudo (o número de espécies, o número de genótipos e a divergência genética) afetaram de forma distinta os processos estudados. Contudo, no caso da produção de biomassa pelos fungos, há evidências de complementaridade independentemente das medidas de diversidade analisadas. Foi verificado que as medidas de diversidade de comunidades de plantas, a nível de espécies, grupos funcionais e distância filogenética, se correlacionavam positivamente com a produção de biomassa (Cadotte et al. 2008). Os efeitos de complementaridade, se ocorrerem por diferenciação de nicho, serão positivos até se atingir um nível de diversidade em que ocorre sobreposição de nichos, levando à saturação dos processos. Em plantas, foi verificado que a magnitude do efeito da diversidade intra e interespecífica na produtividade poderá ser equivalente (Cook-Patton 2011); os nossos resultados sugerem que o mecanismo de complementaridade em fungos aquáticos poderá ser igualmente relevante a nível intraespecífico, havendo traços funcionais intraespecíficos suficientemente

distintos para que ocorra diferenciação de nicho e efeitos positivos do aumento da diversidade. Assim, a produção de biomassa foi incrementada devido a mecanismos de complementaridade que dependem da diversidade de traços funcionais nas comunidades e que aumentam com a divergência genética (Woodward 2009). Desta forma, podemos admitir que esta medida de diversidade seja a mais adequada para avaliar os efeitos da diversidade no aumento da biomassa produzida (Cook-Patton 2011).

Por outro lado, o efeito positivo do número de genótipos e da divergência genética na decomposição da folha pode ser devido ao aumento do número de interações de facilitação, por aumento de subprodutos distintos. Contudo, estes mecanismos de facilitação poderão ser atenuados com o aumento do número de genótipos e de interações. Um efeito positivo da divergência genética no crescimento de bactérias correspondeu a uma menor capacidade de resposta a uma bactéria invasora, com o aumento do número de genótipos (Jousset et al. 2011a). No nosso estudo, também na comunidade com mais genótipos a decomposição diminuiu. Assim, os efeitos positivos da diversidade poderão diferir consoante a medida de diversidade e o processo analisado (Jiang et al. 2008). Na decomposição da folhada em ambientes terrestres, foi verificado que a identidade das espécies era mais determinante para o processo, seguindo-se a identidade dos genótipos e só depois a diversidade de genótipos (Crutsinger et al. 2009). No nosso estudo, pelo contrário, o número de genótipos e a identidade genotípica da comunidade foram mais determinantes do que o número e a identidade das espécies presentes na comunidade. Assim, poderá ser relevante avaliar os efeitos da diversidade, a nível dos genótipos e da divergência genética, na decomposição da folhada nos rios.

Em síntese, os resultados deste estudo apoiam a hipótese de que o aumento da diversidade, sobretudo em comunidades com baixa diversidade, terá efeitos positivos nas funções que as espécies e estirpes desempenham nos ecossistemas, como resultado de complementaridade. Estes efeitos positivos foram muito claros na produção de biomassa. Por outro lado, o aumento da biomassa produzida poderá não se traduzir diretamente no aumento do desempenho da comunidade noutros processos. Pode admitir-se que a partir de certo nível de diversidade predominará a redundância, porque a maioria dos nichos ecológicos já estão ocupados. Além disso, podem verificar-se interações antagonísticas com o aumento da diversidade que reduzirão o impacto dos efeitos positivos.

Para melhor se perceber os impactos da diversidade serão necessários mais estudos que

avaliem o efeito da divergência genética das comunidades nos processos que estas promovem nos ecossistemas. A diversidade intraespecífica deverá ser manipulada em diferentes espécies e deverão ser investigados quais os marcadores moleculares que melhor traduzirão a diversidade funcional. Neste trabalho, foram selecionados fungos aquáticos com base em diferenças nas sequências ITS do DNA (Seena et al. 2010a; Seena et al. 2010b), que pareceram traduzir diferenças funcionais dos efeitos da diversidade. Globalmente, os nossos resultados mostraram que a divergência genética das comunidades, refletindo a diversidade funcional, foi um melhor preditor da produção de biomassa; o número de genótipos foi mais relevante para a decomposição da matéria orgânica por fungos aquáticos; e o número de espécies e a identidade de genótipos e das espécies foram determinantes para explicar a esporulação. As diferentes medidas de diversidade avaliadas neste estudo não traduziram sempre as mesmas relações entre a diversidade e os processos analisados e, assim, a utilização de diferentes métricas de biodiversidade é necessária para compreender os impactos funcionais da perda de biodiversidade nos ecossistemas, provavelmente porque diferentes mecanismos explicam os efeitos da biodiversidade em diferentes processos ecológicos relacionados.

5. Bibliografia

- Anderson J.L. & Shearer C.A. (2011) Population genetics of the aquatic fungus *Tetracladium marchalianum* over space and time. Plos One 6 Article Number: e15908.
- Bärlocher F. & Corkum M. (2003) Nutrient enrichment overwhelms diversity effects in leaf decomposition by stream fungi. Oikos 101: 247-252.
- Bärlocher F. (2005a) Biodiversity. In: Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide. Pages: 305-312. Graça M.A.S., Bärlocher F. & Gessner M.O. (Ed.). Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Bärlocher F. (2005b) Freshwater fungal communities. In: The Fungal Community: its Organization and Role in the Ecosystem, 3rd edn. J. Deighton, J.F. White Jr & P. Oudemans (Eds), pp. 39–59. Taylor & Francis, CRC Press, Boca Raton.
- Bärlocher F. (2010) Molecular approaches promise a deeper and broader understanding of the evolutionary ecology of aquatic hyphomycetes. Journal of the North American Benthological Society 29: 1027-1041.
- Barnard P. & Wilfried T. (2008). Introduction. Global change and biodiversity: future challenges. Biology Letters 4: 553-555.
- Bell T., Gessner M.O., Griffiths R.I., McLaren J.R., Morin P.J., van der Heijden M., & van der Putten W.H. (2009) Microbial biodiversity and ecosystem functioning under controlled conditions and in the wild. In: Biodiversity, Ecosystem Functioning, and Human Wellbeing - An Ecological and Economic Perspective. Naeem S., Bunker D.E., Hector A., Loreau M. & Perrings C. (Ed.). Oxford University Press.
- Bracken M.E.S., Friberg S.E., Gonzalez-Dorantes C.A. & Williams, Susan L. (2008) Functional consequences of realistic biodiversity changes in a marine ecosystem. Proceedings of the National Academy of The United States of America 105: 924-928.
- Butchart S.H.M., Walpole M., Collen B., van Strien A., Scharlemann J.P.W., Almond R.E.A, Baillie J.E.M., Bomhard B., Brown C., Bruno J., Carpenter K., Carr G.M., Chanson J., Chenery A.M., Csirke J., Davidson N.C., Dentener F., Foster M., Galli A., Galloway J.N., Genovesi P., Gregory R.D., Hockings M., Kapos V., Lamarque J-F., Leverington F., Loh J., McGeoch M.A., McRae L., Minasyan A., Morcillo M.H., Oldfield T.E.E., Pauly D., Quader S., Revenga C., Sauer J.R., Skolnik B., Spear D., Stanwell-Smith D., Stuart S., Symes A.,

- Tierney M., Tyrrell T.D., Vie J-C. & Watson R. (2010) Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328: 1164–1168.
- Cadotte M.W., Cardinale B.J. & Oakley T.H. (2008) Evolutionary history and the effect of biodiversity on plant productivity. *Proceedings of the National Academy of The United States of America* 105: 17012-17017.
- Cardinale B.J., Palmer M.A. & Collins S.L. (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* 415: 426-429.
- Cardinale B.J. (2011) Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature* 472: 86-U113.
- Cavender-Bares J., Kozak K.H., Fine P.V.A. & Kembel S.W. (2009) The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12: 693-715.
- Chiarucci A., Bacaro G. & Scheiner S.M. (2011) Old and new challenges in using species diversity for assessing biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences* 366: 2426-2437.
- Cook-Patton S.C., McArt S.H., Parachnowitsch A.L., Thaler J.S. & Agrawal A.A. (2011) A direct comparison of the consequences of plant genotypic and species diversity on communities and ecosystem function. *Ecology* 92: 915-923.
- Costantini M.L. & Rossi L. (2010) Species diversity and decomposition in laboratory aquatic systems: the role of species interactions. *Freshwater Biology* 55: 2281-2295.
- Crutsinger G.M., Sanders N.J. & Classen A.T. (2009) Comparing intra- and inter-specific effects on litter decomposition in an old-field ecosystem. *Basic and Applied Ecology* 10: 535-543.
- Dang C.K., Chauvet E. & Gessner M.O. (2005) Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships. *Ecology Letters* 8: 1129-1137.
- De Deyn G.B., Quirk H. & Bardgett R.D. (2011) Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biology Letters* 7: 75-78.
- Diaz S., Fargione J., Chapin F.S. & Tilman D. (2006). Biodiversity loss threatens human well-being. *Plos Biology* 4: 1300-1305.
- Duarte S., Pascoal C., Cássio F. & Bärlocher F. (2006) Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia* 147: 658-666.

- Duffy M.A. (2010) Ecological consequences of intraspecific variation in lake Daphnia. *Freshwater Biology* 55: 995-1004.
- Fargione J., Tilman D., Dybzinski R., Hille Ris Lambers J., Clark C., Harpole W.S., Knops J.M., Reich P.B. & Loreau M. (2007) From selection to complementarity: shifts in the causes of biodiversity-productivity relationships in a long-term biodiversity experiment. *Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences* 274: 871-876.
- Fernandes I., Pascoal C. & Cassio F. (2011) Intraspecific traits change biodiversity effects on ecosystem functioning under metal stress. *Oecologia* 166: 1019-1028.
- Flynn D.F.B., Mirotnick N., Jain M., Palmer M.I. & Naeem, S. (2011) Functional and phylogenetic diversity as predictors of biodiversity-ecosystem-function relationships. *Ecology* 92: 1573-1581.
- Fox J.W. (2005) Interpreting the 'selection effect' of biodiversity on ecosystem function. *Ecology Letters* 8: 846-856.
- Gamfeldt L. & Hillebrand H. (2008) Biodiversity effects on aquatic ecosystem functioning - maturation of a new paradigm. *International Review of Hydrobiology* 93: 550-564.
- Gessner M.O. (2005) Ergosterol as a measure of fungal biomass, p. 171–176. In: Graça M.A.S., Bärlocher F. & Gessner M.O. (Ed.), *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gessner M.O.; Gulis V.; Kuehn K.A., Chauvet E. & Superkropp K. (2007) Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems, p. 301-324. In: *Mycota Book Series: A Comprehensive Treatise on Fungi As Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Kubicek C.P. & Druzhinina I.S. (Eds.). Springer- Verlag Berlin, Germany.
- Gessner M.O., Swan C.M., Dang C.K., McKie B.G., Bardgett R.D., Wall D.H. & Hättenschwiler S. (2010) Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 372-380.
- Gravel D., Bell T., Barbera C., Bouvier T., Pommier T., Venail P. & Mouquet N. (2011) Experimental niche evolution alters the strength of the diversity-productivity relationship. *Nature* 469: 89-U1601.
- Hargrave C.W., Hambright K.D. & Weider L.J. (2011) Variation in resource consumption across a gradient of increasing intra- and interspecific richness. *Ecology* 92: 1226-1235.
- Hättenschwiler S., Fromin N. & Barantal S. (2011) Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *Comptes Rendus Biologies* 334: 393-402.

- Heemsbergen D.A., Berg M.P., Loreau M., van Haj J.R., Faber J.H. & Verhoef H.A. (2004) Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity. *Science* 306: 1019-1020.
- Hossain M.Z. & Sugiyama S. (2011) Influences of plant litter diversity on decomposition, nutrient mineralization and soil microbial community structure. *Grassland Science* 57: 72-80.
- Howe M.I. & Suberkropp K. (1994) Effects of isopod (*Lirceus* sp) feeding on aquatic hyphomycetes colonizing leaves in a stream. *Archiv fur Hydrobiologie* 130: 93-103.
- Hughes A.R., Inouye B.D., Johnson M.T.J., Underwood N. & Vellend M. (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11: 609-623.
- Jiang L., Pu Z. & Nemergut D.R. (2008) On the importance of the negative selection effect for the relationship between biodiversity and ecosystem functioning. *Oikos* 117: 488-493.
- Jiang L., Wan S. & Li L. (2009) Species diversity and productivity: why do results of diversity-manipulation experiments differ from natural patterns? *Journal of Ecology* 97: 603-608.
- Jousset A., Schulz W., Scheu S. & Eisenhauer N. (2011a) Intraspecific genotypic richness and relatedness predict the invasibility of microbial communities. *The ISME Journal* 5: 1108-1114.
- Jousset A., Schmid B., Scheu S. & Eisenhauer N. (2011b) Genotypic richness and dissimilarity opposingly affect ecosystem functioning. *Ecology Letters* 14: 537-545.
- King, I. (2009) The need for the incorporation of phylogeny in the measurement of biological diversity, with special reference to ecosystem functioning research. *BioEssays* 31: 107-116.
- Kominoski J.S., Hoellein T.J., Leroy C.J., Pringle C.M. & Swan C.M. (2010) Beyond species richness: expanding biodiversity-ecosystem functioning theory in detritus-based streams. *River Research and Applications* 26: 67-75.
- Krauss G.J., Sole M., Krauss G., Schlosser D., Wesenberg D. & Bärlocher F. (2011). Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 620-651.
- Laitung B., Chauvet E., Feau N., Fève K., Chikhi L. & Gardes M. (2004) Genetic diversity in *Tetrachaetum elegans*, a mitosporic aquatic fungus. *Molecular Ecology* 13: 1679-1692.
- Lecerf A. & Chauvet E. (2008) Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshwater Biology* 53: 1658-1672.

- Lecerf A. & Richardson J.S. (2010) Biodiversity-Ecosystem Function Research: Insights Gained from Streams. *River Research and Applications* 26: 45-54.
- Loreau M. & Hector A. (2001) Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412: 72-76.
- Loreau M. (2010) Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365: 49-60.
- McGuire K.L. & Treseder K.K. (2010a) Microbial communities and their relevance for ecosystem models: decomposition as a case study. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 529-535.
- McGuire K.L., Bent E., Borneman J., Majumder A., Allison S.D. & Treseder K.K. (2010b) Functional diversity in resource use by fungi. *Ecology* 91: 2324-2332.
- McKie B.G., Woodward G., Hladyz S., Nistorescu M., Preda E., Popescu C., Giller P.S. & Malmqvist B. (2008) Ecosystem functioning in stream assemblages from different regions: contrasting responses to variation in detritivore richness, evenness and density. *Journal of Animal Ecology* 77: 495-504.
- Michel L. (2010) Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences* 365: 49-60.
- Nielsen U.N., Ayres E., Wall D.H. & Bardgett R.D. (2011) Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science* 62: 105-116.
- Nikolcheva L.G., Bourque T., & Bärlocher F. (2005) Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycological Research* 109: 246-253.
- O'Gorman E.J., Yearsley J.M., Crowe T.P., Emmerson M.C., Jacob U. & Petchey O. (2011) Loss of functionally unique species may gradually undermine ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 278: 1886-1893.
- Pascoal C., Pinho M., Cássio F. & Gomes P. (2003) Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: studies on a polluted river. *Freshwater Biology* 48: 2033-2044.
- Pascoal C. & Cássio F. (2004) Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5266-5273.
- Pascoal C., Marvanová L. & Cássio F. (2005) Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal. *Fungal Diversity* 19:109-128

- Pascoal C. & Cássio F. (2008) Linking fungal diversity to the functioning of freshwater ecosystems. In: Novel Techniques and Ideas in Mycology. Sridhar K.R., Bärlocher F. & Hyde K.D (Ed.). Fungal Diversity Press. Hong Kong, 1-15.
- Pascoal C., F. Cássio, Nikolcheva L.G. & Bärlocher F. (2010) Realized fungal diversity increases functional stability of leaf-litter decomposition under zinc stress. *Microbial Ecology* 59: 84-93.
- Power L.D. & Cardinale B.J. (2009) Species richness enhances both algal biomass and rates of oxygen production in aquatic microcosms. *Oikos* 118: 1703-1711.
- Reiss J, Bridle JR, Montoya JM, Woodward G (2009) Emerging horizons in biodiversity and ecosystem functioning research. *Trends in Ecology & Evolution* 24:505-514.
- Reiss J., Forster J., Cássio F., Pascoal C., Stewart R. & Hirst A.G. (2010) When Microscopic Organisms Inform General Ecological Theory. In: *Advances in Ecological Research Integrative Ecology: From Molecules to Ecosystems*. Woodward G. (Ed.) 43: 45-85.
- Romani A., Artigas J., Camacho A., Graça M.A.S. & Pascoal C. (2009). Diversidad fúngica - la biota de los ríos: los microorganismos heterótrofos. In: *Conceptos y Técnicas para el estudio de la ecología de ríos*. Elosegui A. & Sabater S. (Ed.) Fundación BBVA.
- Romanuk T.N., Vogt R.J., Young A., Tuck C. & Carscadden M.W. (2010) Maintenance of positive diversity-stability relations along a gradient of environmental stress. *Plos One* 5: Article Number e10378.
- Seena S., Pascoal C., Marvanova L. & Cássio F. (2010a) DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity* 44: 77-87.
- Seena S., Duarte S., Pascoal C. & Cássio F. (2010b) ITS barcodes as unambiguous discriminators of strains of *Articulospora tetracladia*. 2nd Meeting of the European Consortium for the Barcode of Life (ECBOL 2), Braga, Portugal 2-4 June 2010.
- Sridhar K.R. & Bärlocher F. (1992) Endophytic aquatic hyphomycetes of roots of Spruce, Birch and Maple. *Mycological Research* 96: 305-308.
- Sridhar K., Krauss G., Bärlocher F., Raviraja N., Wennrich R., Baumbach R. & Krauss G.J. (2001) Decomposition of alder leaves in two heavy metal-polluted streams in central Germany. *Aquatic Microbial Ecology* 26: 73-80.

- Sridhar K.R., Bärlocher F., Krauss G.J. & Krauss G. (2005) Response of aquatic hyphomycete communities to changes in heavy metal exposure. *International Review of Hydrobiology* 90: 21-32.
- Suberkropp K. (1998) Microorganisms and organic matter decomposition. In: *River Ecology and Management: Lessons From the Pacific Coastal Ecoregion*, Naiman R.J. & Bilby R.E. (Eds), pp. 120–143. Springer, New York.
- Thebault E. & Loreau M. (2003) Food-web constraints on biodiversity-ecosystem functioning relationships. *Proceedings of the National Academy of The United States of America* 100: 14949-14954.
- Tilman D. (2000) Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Nature* 405: 208-211.
- Tiunov A.V. & Scheu S. (2005) Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecology Letters* 8: 618-625.
- Treton C., Chauvet E. & Charcosset J.Y. (2004) Competitive interaction between two aquatic hyphomycete species and increase in leaf litter breakdown. *Microbial Ecology* 48: 439-446.
- Wagg C., Jansa J., Stadler M., Schmid B. & van der Heijden M.G.A. (2011) Mycorrhizal fungal identity and diversity relaxes plant-plant competition. *Ecology* 92: 1303-1313.
- Wilkinson A. & Solan M., Taylor A.F.S., Alexander I.J. & Johnson D. (2010) Intraspecific diversity regulates fungal productivity and respiration. *Plos One* 5: Article Number: e12604.
- Wilkinson A., Alexander I.J. & Johnson D. (2011) Species richness of ectomycorrhizal hyphal necromass increases soil CO₂ efflux under laboratory conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1350-1355.
- Woodward G. (2009) Biodiversity, ecosystem functioning and food webs in fresh waters: assembling the jigsaw puzzle. *Freshwater Biology* 54: 2171-2187.
- Yachi S. & Loreau M. (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1463-1468.
- Zhang Q.G. & Zhang D.Y. (2006) Species richness destabilizes ecosystem functioning in experimental aquatic microcosms. *Oikos* 112: 218-226.